

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS CONTENDO
ÓLEO DE *Copaifera reticulata* Ducke

CAROLINA CARVALHO PACHECO

MANAUS - AM

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAROLINA CARVALHO PACHECO

DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS CONTENDO
ÓLEO DE *Copaifera reticulata* Ducke

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Bioanálises e Desenvolvimento de Produtos Farmacêuticos.

Orientadora: Profa. Dra. Tatiane Pereira de Souza

MANAUS - AM

2014

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS CONTENDO ÓLEO
DE *Copaifera reticulata* Ducke**

CAROLINA CARVALHO PACHECO

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração: Bioanálises e Desenvolvimento de Produtos Farmacêuticos, Linha de pesquisa: Desenvolvimento, Avaliação da Qualidade e da Utilização de Insumos e Produtos Farmacêuticos e Cosméticos. Aprovada em sua versão final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Prof. Dr. José Pereira de Moura Neto
Coordenador PPGCF

Apresentada perante a Banca Examinadora composta pelos professores:

Profa. Dra. Tatiane Pereira de Souza – Presidente e Orientadora
Universidade Federal do Amazonas

Profa. Dra. Maria Meneses Pereira – Membro Interno
Universidade Federal do Amazonas

Profa. Dra. Maria Meneses Pereira – Membro Externo
Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto

Manaus, 07 de Agosto de 2014

Dedico a Deus, a minha família e aos
meus amigos

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me ajudado a ser forte diante de tantas dificuldades. A Nossa Senhora do Amparo pelo seu manto protetor e a São José pela sua interseção e proteção.

Aos meus pais (Suely e Onesindo), meu irmão (Leonardo), Tia Stela, Tio Ormail e demais familiares, por sempre acreditarem em mim, pelos valores de vida que me ensinaram com tanta sabedoria, pela compreensão em tantos momentos de ausência e por sempre me incentivarem e ajudarem quando mais necessitei.

A minha orientadora Profa. Dra. Tatiane Pereira de Souza, por seu incentivo, ensinamentos, correções, apoio e compreensão no decorrer deste trabalho.

Aos amigos:

- Danielle Silva, Deborah Holanda, Ester Moraes, Gisele Pontes, Kazumi Eto, Queliane Alves, Querciane Alves, Tuza Aguiar;
 - Ana Cláudia Santos, Anne Almeida, Bárbara Yole, Karolina Sabino, Larissa Moraes, Marcelo Brito, Thaira Marrony.
 - Enderson Araújo, Márcio Pinto, Márcio Oliveira e Thiago Bravo;
- pelos desabafos e pela paciência em me ouvir, trocando sempre experiências positivas, incentivos e compreendendo os momentos de ausência.

Aos amigos de turma de Mestrado:

- Ana Carolina, Cláudia Melo, Jessyca Celestino e Hellen Sena: pela amizade desde os tempos de graduação;
- Chanderlei Tavares e Rodrigo Souza: por me fazerem esperar todo dia para almoçarmos juntos, sobretudo pelas ajudas no laboratório e me aturarem.
- Nayana Yared e Sheila Caetano: as minhas “orientadas”, com as quais mais aprendi que ajudei.
- Ellen, Fernanda, Neila, Natacha, Socorro: por ter a oportunidade de nos conhecermos e trocarmos conhecimentos.

Ao professor Valdir Veiga e o grupo Q-Bioma pelo fornecimento do óleo de Copaíba, orientações na qualificação e por abrir as portas do Laboratório. Agradecimento especial aos alunos do grupo: Paula Barbosa e Fabiano Vargas por tirarem minhas dúvidas e me ajudarem.

Ao professor Dr. Jairo Kennup Bastos, do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto (USP-FCFRP), por abrir as portas do laboratório e me receber tão bem.

Aos amigos que fiz no Laboratório de Farmacognosia, em especial a Tatiane Carvalho por sua especial atenção, paciência, ajuda constante e conselhos. Sem sua ajuda, não conseguiria concluir esse trabalho. Angélica, Bruno, Cristiane, Daniella, Erick, Juliana, Marcela, Marivane, Mário, Mariza, Rosana pelas dicas, ajudas constantes e fizeram eu me sentir como se estivesse em casa. Ao Federico pela amizade, conversas, passeios, convívio, você me ajudou muito. Ao Professor Dr. Fernando Costa e Professora Dra. Nieve Furtado pelas orientações e conversas.

Ao professor Dr. Luis Alexandre Pedro de Freitas do Laboratório de Física Industrial da USP-FCFRP pela oportunidade e abrir espaço no laboratório para que eu pudesse realizar os experimentos. A Ana Rita, pela ajuda, disponibilidade e contribuição para realização desse trabalho permitindo obter resultados para conclusão deste trabalho. A Áurea, Cristina, Marcela, Elane pela companhia e ajuda no laboratório.

A professora Dra Letícia Scherer Koester e Letícia Lucca da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelas orientações e auxílio na realização da eficiência de encapsulação das nanocápsulas.

A minha amiga de laboratório e de viagem Isis Costa por me ouvir, pelas dicas, conselhos e aflições compartilhadas.

Aos colegas de Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (Jackeline, Lorena, Deizi, Açussena). A Priscila Tobias pela ajuda constante principalmente no reômetro e conversas. Ao Fabrício por ter se aventurado comigo na Reserva Ducke para coleta dos óleos e me ajudar nos experimentos. Ao técnico Newton pela ajuda.

Ao senhor Edmilson pelos ensinamentos e nos ajudar na coleta dos óleos de Copaíba.

Aos professores e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Ao professor Adley Lima pelas dicas na qualificação e pela ajuda no decorrer do trabalho.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas e ao Instituto de Pesquisas da Amazônia pela oportunidade.

A UFAM, FAPEAM e CNPQ pelo apoio financeiro e a CAPES pela concessão de bolsa de estudo.

Agradeço a todos que não foram citados, mas que de alguma forma me ajudaram na realização desse trabalho.

MUITO OBRIGADA!!!

A persistência é o caminho do êxito

Charles Chaplin

RESUMO

Nanopartículas poliméricas, como as nanocápsulas, são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a 1 μm , compostas por um núcleo lipofílico envolvido por uma parede polimérica e estabilizadas por meio de tensoativo. Elas têm recebido importância na área farmacêutica devido às suas potencialidades terapêuticas e cosméticas, tais como, melhora na biodisponibilidade e redução dos efeitos adversos de fármacos e ou ativos biológicos. *Copaifera reticulata* Ducke é uma das espécies do gênero *Copaifera* da qual é extraído um óleo-resina chamado óleo de copaíba, amplamente utilizado em diferentes regiões do país, especialmente na Região Amazônica. Este óleo tem sido utilizado popularmente como anti-inflamatório, cicatrizante, anti-séptico, antitumoral, dentre outras atividades. Porém, a diversidade química de substâncias presentes no óleo, aliada as altas temperaturas da região amazônica, favorecem processos reacionais diminuindo a estabilidade química e terapêutica desse produto, além de dificultar a obtenção de produtos derivados com qualidade. Sendo assim, o trabalho teve como principal objetivo desenvolver nanocápsulas contendo óleo de *C. reticulata* utilizando o método de deposição interfacial de um polímero pré-formado. Inicialmente, foram obtidos e caracterizados diferentes óleos-resinas de copaíba (*C. multijuga* Hayne e *C. reticulata*) através das análises físico-químicas: densidade, índice de refração, viscosidade e análise cromatográfica. Para o desenvolvimento das nanocápsulas foi utilizado um planejamento fatorial do tipo 2^2 , replicado, onde foi avaliado a influência de dois tipos de polímeros (Poli- ϵ -caprolactona e Poli-ácido láctico co-glicólico) e duas diferentes concentrações do óleo-resina de *C. reticulata* (2,5% e 5,0%), sobre o diâmetro médio de partícula, o potencial zeta e o pH das nanocápsulas obtidas. Além disso, as mesmas foram caracterizadas através da distribuição do diâmetro médio das partículas, índice de polidispersão, comportamento reológico, taxa de encapsulação e, realização de um estudo preliminar de estabilidade por um período de 120 dias. O estudo de caracterização físico-química dos óleos de *C. multijuga* e *C. reticulata* mostrou que há uma diferença significativa entre alguns parâmetros estudados com variações intra e entre espécies. O constituinte majoritário para o óleo de *C. reticulata* foi o β -bisaboleno e para os diferentes óleos de *C. multijuga* estudados o constituinte principal foi o β -cariofileno. A preparação e a caracterização das nanocápsulas apresentaram parâmetros adequados para as mesmas, mostrando, inclusive, uma estabilidade preliminar. As nanocápsulas contendo 2,5% do óleo-resina de copaíba e formadas pelo polímero poli- ϵ -caprolactona apresentaram, de modo geral, os melhores parâmetros físico-químicos. Assim, foi possível obter nanocápsulas contendo *C. reticulata* Ducke dentro de parâmetros aceitáveis, os quais precisam ainda ser otimizados a fim de proporcionar a elaboração futura de uma forma farmacêutica final.

Palavras-chave: Copaíba, óleo-resina, sistemas nanoencapsulados

ABSTRACT

Polymeric nanoparticles such as nanocapsules are carriers for drugs systems which have a diameter of less than 1 μm , composed of a lipophilic core surrounded by a polymeric wall and stabilized by surfactant. They have been important in pharmaceutical field due to their therapeutic potential, such as improved drug bioavailability and reduced adverse drug effects. *Copaifera reticulata* Ducke is a species of the genus *Copaifera* which is extracted an oleoresin called copaiba oil, widely used in different regions of the country, especially in the Amazon region. This oil has been used popularly as anti-inflammatory, healing, antiseptic, anti-tumor, among other activities. However, the diversity of chemical substances present in the oil, combined with the high temperatures of the Amazon region, favoring reaction processes decreasing the therapeutic and chemical stability of the product, and difficult to obtain derived products with quality. Thus, the study aimed to obtain nanocapsules containing oil of *C. reticulata* using solvent displacement or interfacial deposition method. Initially, were obtained and characterized different Copaiba oil (*C. multijuga* Hayne and *C. reticulata*) through physical-chemical analysis: density, refractive index, viscosity and chromatographic analysis. For the development of nanocapsules was used a factorial design type 2^2 , replicated, which assessed the influence of two types of polymers (poly- ϵ -caprolactone and poly lactic acid-co-glycolic acid) and two different concentrations of oil-resin *C. reticulata* (2.5% and 5.0%) on the average particle diameter, zeta potential and pH of the nanocapsules obtained. Furthermore, they were characterized by the distribution of the average particle diameter, polydispersity index, rheology, encapsulation rate, and conducting a preliminary stability study for a period of 120 days. The physico-chemical characterization study of the oils of *C. reticulata* and *C. multijuga* showed that there is a significant difference between some parameters studied intra and interspecies variations. The major constituent for oil from *C. reticulata* was the β -bisabolene and for different oils *C. multijuga* studied the main constituent was β -caryophyllene. The preparation and characterization of nanocapsules showed adequate parameters for them, even showing a preliminary stability. Nanocapsules containing 2.5% oleoresin of copaiba and formed by poly- ϵ -caprolactone showed, in general, the best physico-chemical parameters. Thus, it was possible to obtain nanocapsules containing *C. reticulata* Ducke within acceptable parameters, which still need to be optimized to provide the future development of a final pharmaceutical form.

Keywords: copaiba, oil-resin, systems nanoencapsulated

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais sesquiterpenos encontrados em óleo de copaíba.....	26
Figura 2 - Principais diterpenos encontrados em óleo de copaíba	27
Figura 3 - Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.....	34
Figura 4 – Representação esquemática de preparação de nanocápsulas obtidas pelo método deposição do polímero pré-formado.....	36
Figura 5 - Comportamento reológico para os óleos de <i>Copaifera multijuga</i> Hayne (OCM) a 25 °C	56
Figura 6 - Comportamento reológico para o óleo de <i>Copaifera reticulata</i> Ducke (OCR) a 25 °C.....	56
Figura 7 - Diagrama de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para os óleos de <i>Copaifera multijuga</i> Hayne (OCM) a 25 °C	57
Figura 8 - Diagrama de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para o óleo de <i>Copaifera reticulata</i> Ducke (OCR) a 25 °C.....	57
Figura 9 - Perfil cromatográfico dos óleos <i>C. multijuga</i> Hayne (OCM) por CG-DIC.....	59
Figura 10 - Perfil cromatográfico dos óleos <i>C. multijuga</i> Hayne (OCM) e <i>C. reticulata</i> Ducke (OCR) por CG-DIC.....	60
Figura 11 - Perfil cromatográfico do padrão óxido de cariofileno.....	61
Figura 12 – Gráfico de Pareto mostrando a influência do tipo de polímero (A) e do volume de óleo de copaíba (B) sobre o potencial zeta (PZ) encontrado nas NCs de OCR	71
Figura 13 – Gráfico de Pareto mostrando a influência do tipo de polímero (A) e do volume de óleo de copaíba (B) sobre o tamanho de partícula (TP) encontrado nas NCs de OCR.....	72
Figura 14 – Gráfico de Pareto mostrando a influência do tipo de polímero (A) e do volume de óleo de copaíba (B) sobre o pH encontrado nas NC de OCR.....	72
Figura 15 – Aspecto macroscópico nanocápsulas	73
Figura 16 – Teste de centrifugação	73
Figura 17 – Diâmetros médios das partículas das NCs durante 4 meses	74
Figura 18 – Índices de polidispersão das NCs durante 4 meses.....	74
Figura 19 – Distribuição monomodal da Nanocápsulas.....	75
Figura 20 – Potencial Zeta das NCs durante 4 meses	76

Figura 21 – Determinação do pH das NCs durante 4 meses	77
Figura 22 - Comportamento reológico para as nanocápsulas a 25 °C.....	79
Figura 23 - Diagrama de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para as nanocápsulas a 25 °C.....	79
Figura 24 - Fotomicrografia da Nanocápsula 1 pelo AFM	80
Figura 25 - Perfil cromatográfica do padrão ácido caurenóico em 254 nm	81
Figura 26 - Eluição cromatográfica do óleo de <i>C. reticulata</i> Ducke em 254 nm.....	81
Figura 27 - Curva de calibração do ácido caurenóico	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 A - Espécies de óleo-resina de <i>Copaifera</i> testadas em diferentes atividades biológicas.....	28
Tabela 1B - Tabela 1B - Espécies de óleo-resina de <i>Copaifera</i> testadas em diferentes atividades biológicas	29
Tabela 2 - Desenho fatorial do tipo 2 ²	46
Tabela 3 - Matriz do planejamento fatorial 2 ² aplicado ao preparo de NC de óleo de <i>C. reticulata</i>	47
Tabela 4 – Parâmetros utilizados para análise das nanocápsulas no equipamento Zetasizer®	48
Tabela 5 - Gradiente de eluição do sistema cromatográfico	50
Tabela 6 - Caracterização físico-química dos óleos de Copaíba	53
Tabela 7 - Principais tempos de retenção e as áreas das substâncias presentes nos óleos de <i>C. reticulata</i> Ducke (OCR) e <i>C. multijuga</i> Hayne (OCM) por CG-DIC.....	61
Tabela 8 - Composição percentual dos <i>C. multijuga</i> Hayne (OCM) e <i>C. reticulata</i> Ducke (OCR).....	63
Tabela 9 – Resultados do Potencial Zeta (PZ), Diâmetro médio de partícula (TP) e Índice de Polidispersão (IPD) para o planejamento fatorial do tipo 2 ²	71
Tabela 10 - Repetibilidade do padrão ácido caurenóico.....	82
Tabela 11 – Eficiência de encapsulação das nanocápsulas	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC - Ácido Caurenóico

AFM - Microscopia de força atômica

CG/DIC - Cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de ionização de chama

CG/EM - Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IPD – Índice de polidispersão

IR – Índice de Refração

NC – Nanocápsula

OC – Óleo de Copaíba

OCM – Óleo de *Copaifera multijuga* Hayne

OCR – Óleo de *Copaifera reticulata* Ducke

PCL - Poli- ϵ -caprolactona

PLGA - Poli D, L - ácido láctico-co-glicólico

PZ – Potencial Zeta

SPAN 60[®] - Monoestearato de Sorbitano

TP – Diâmetro médio de partícula

TWEEN 80[®] - Monolaurato de polioxietileno sorbitano

SUMÁRIO

Resumo	viii
Abstract.....	ix
Lista de figuras	x
Lista de tabelas	xii
Lista de abreviaturas e siglas	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1 Copaíba (<i>Copaifera</i> sp)	21
3.1.1 <i>Copaifera multijuga</i> Hayne	22
3.1.2 <i>Copaifera reticulata</i> Ducke	22
3.1.3 Óleo de Copaíba	22
3.1.3.1 Propriedades e uso	24
3.1.3.2 Composição Química	25
3.1.3.3 Atividades biológicas do óleo de copaíba	27
3.1.3.4 Atividade biológicas dos principais sesquiterpenos e diterpenos de óleo de copaíba	31
3.2 Nanotecnologia e Nanopartículas poliméricas	32
3.2.1 Métodos de obtenção	35
3.2.2 Caracterização das suspensões de nanocápsulas	38
4 METODOLOGIA.....	40
4.1 Obtenção do óleo de Copaíba (<i>C. multijuga</i> Hayne e <i>C. reticulata</i> Ducke)	42
4.2 Caracterização físico-químico do OC.....	42
4.2.1 Densidade relativa	43
4.2.2 Índice de refração	43
4.2.3 Viscosidade.....	43
4.2.4 Análises Cromatográficas.....	44
4.2.4.1 Cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de ionização de chama (CG/DIC)	44

4.2.4.2 Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM).....	44
4.3 Obtenção das NCs de OC	45
4.3.1 Obtenção das NCs de OC – Estudo piloto com óleo de <i>C. multijuga</i> Hayne....	45
4.3.2 Obtenção das NCs de óleo <i>C. reticulata</i> Ducke	46
4.4 Avaliação da influência do tipo de polímero e concentração de óleo na obtenção das NC de óleo de <i>C. reticulata</i> Ducke	46
4.5 Avaliação das suspensões de NC contendo óleo de <i>C. reticulata</i> Ducke.....	47
4.5.1 Teste de centrifugação	47
4.5.2 Distribuição do tamanho médio das partículas e índice de polidispersão	48
4.5.3 Potencial Zeta	48
4.5.4 Determinação do pH	48
4.5.5 Avaliação do comportamento reológico.....	49
4.5.6 Microscopia de força atômica (AFM)	49
4.5.7 Taxa de encapsulação	49
4.5.7.1 Preparo das amostras de NCs	50
4.5.7.2 Condições cromatográficas.....	50
4.5.7.3 Curva de calibração do ácido caurenóico (AC).....	51
4.5.7.4 Limite de detecção.....	51
4.5.7.5 Limite de quantificação	51
4.5.7.6 Repetibilidade.....	52
4.6 Análise estatística	52
5 RESULTADOS	53
5.1 Caracterização físico-química dos OC	53
5.1.1 Análises Cromatográficas.....	58
5.2 Obtenção das NCs de OC	69
5.2.1 Obtenção das NCs de OC – Estudo piloto com óleo de <i>C. multijuga</i> Hayne....	69
5.2.2 Obtenção das NCs de óleo <i>C. reticulata</i> Ducke	70
5.3 Avaliação da influência do tipo de polímero e concentração de óleo na obtenção das NC de óleo de <i>C. reticulata</i> Ducke	70
5.4 Avaliação das suspensões de NCs contendo óleo de <i>C. reticulata</i> Ducke.....	73
5.4.1 Teste de centrifugação	73
5.4.2 Distribuição do tamanho médio das partículas e índice de polidispersão	74
5.4.3 Potencial Zeta	76

5.4.4 Determinação do pH.....	77
5.4.5 Avaliação do comportamento reológico.....	78
5.4.6 Microscopia de força atômica (AFM)	79
5.4.7 Taxa de encapsulação	80
5.4.7.1 Condições cromatográficas.....	81
5.4.7.2 Curva de calibração do ácido caurenóico (AC).....	81
5.4.7.3 Limite de detecção e Limite de quantificação	82
5.4.7.4 Repetibilidade	82
5.4.7.5 Taxa de encapsulação das NCs.....	83
6 CONCLUSÃO.....	85
REFERÊNCIAS	87

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais com finalidade terapêutica ultrapassou todas as barreiras e obstáculos durante o desenvolvimento sócio cultural e chegou até os dias atuais, sendo utilizada pela população, em geral, tanto para a cura como alívio de diversas enfermidades (RAMOS, 2006; BADKE, 2012).

As plantas são conhecidamente fontes naturais de inúmeras substâncias que, normalmente, são produzidas pelo vegetal como mecanismo de defesa contra algum agente patogênico e, sendo assim, alguns óleos vegetais apresentam interessantes atividades biológicas com destaque para propriedades anti-inflamatórias, cicatrizantes e antimicrobianas (MORETTI *et al.*, 2002). Os óleos vegetais têm se destacado como matéria-prima ativa bastante promissora, uma vez que podem ser rapidamente degradados e, praticamente, não apresentam toxicidade e/ou problemas ambientais (MORETTI *et al.*, 2002; SIMÕES & SPITZER, 2004).

Dentre as espécies vegetais produtora de óleos destaca-se o gênero *Copaifera* constituído de espécies de elevado valor econômico e ecológico, não somente na Amazônia, mas em todo o continente Sul-Americano (VEIGA JUNIOR *et al.*, 2007_a). Suas árvores exudam um óleo-resina conhecido, popularmente, como óleo de copaíba cujas propriedades medicinais, cosméticas e industriais são amplamente descritas na literatura, destacando-se ação anti-inflamatória, antimicrobiana, antisséptica, cicatrizante, antitumoral, dentre outras (GARCIA & YAMAGUCHI, 2012).

Apesar das diversas vantagens e das perspectivas promissoras dos óleos oriundos de espécies vegetais, existem vários obstáculos tecnológicos que dificultam o emprego e comercialização dos mesmos, baixa solubilidade, podem sofrer oxidação, odor e sabor desagradável. Tais obstáculos têm que ser solucionados antes que estes compostos possam ser efetivamente utilizados (MORETTI *et al.*, 2002; DIAS *et al.*, 2012).

O uso de micro e nanopartículas tem sido alvo de investimentos na área farmacêutica em todo o mundo. Nesse contexto, as nanopartículas (por exemplo, as

nanocápsulas), são sistemas carreadores de substâncias ativas com diâmetro inferior a 1 µm constituídas por polímeros biodegradáveis, representam interessante alternativa tecnológica para veiculação de óleos vegetais e viabilidade de comercialização, possibilitando obter um produto tecnológico, com segurança e eficácia comprovada, aumentando a estabilidade química das substâncias, delimitando a sua ação, prolongando o tempo de atividade e mascarando o odor característico desses óleos (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Entre as inúmeras utilizações desses sistemas destacam-se aplicações dermatológicas, parenterais, orais e oftálmicas. As pesquisas relacionadas à veiculação de óleos vegetais através de sistemas nanopoliméricos têm demonstrado sua eficácia na proteção dos óleos contra degradação ambiental, permitem modular sua liberação, além de prevenir a evaporação no caso dos óleos voláteis (LAI *et al.*, 2006). Recentemente, tem tido um aumento interessante na preparação de nanocápsulas poliméricas com óleos vegetais, como por exemplo, utilizando óleo de girassol, linhaça, castanha do Brasil (SANTOS *et al.*, 2014).

A extração e a comercialização do óleo de copaíba representa uma viável fonte de renda para comunidades locais e ribeirinhas da Região Amazônica. No entanto, o estabelecimento de estratégias políticas para o desenvolvimento de ações visando à busca dos potenciais biotecnológicos desse óleo é fundamental para diminuir as dificuldades locais na comercialização e negociação desse produto no mercado internacional.

O potencial farmacológico e comercial do óleo de copaíba, principalmente para região Amazônica, ainda justificam estudos que visem o desenvolvimento tecnológico de produtos contendo essa matéria-prima. Portanto, o presente trabalho é importante para a Região Amazônica, uma vez que está relacionado com estudos de processamento tecnológico e desenvolvimento de formas farmacêuticas fazendo uso da nanotecnologia a partir de matéria-prima oriunda da Floresta Amazônica.

Este trabalho trata-se do primeiro estudo envolvendo óleo de copaíba no desenvolvimento de nanocápsulas. Estudos existentes, desenvolveram apenas

nanoemulsões (DIAS *et al.*, 2012) e microcápsulas (RAMOS, 2006) utilizando óleo de copaíba.

A evolução de novas tecnologias, inclusive da nanociência e nanotecnologia, pode ser verificada de forma rápida a partir de uma análise do panorama de artigos científicos publicados e, ainda, de patentes depositadas envolvendo-as. Mesmo com as inúmeras patentes já depositadas, apenas pouco mais de 20 nanomedicamentos estão disponíveis no mercado mundial, enquanto que inúmeros outros ainda encontram-se em estudos clínicos (DIMER *et al.*, 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Desenvolver nanocápsulas contendo óleo-resina de *Copaifera reticulata* Ducke.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterização físico-química do óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne e *Copaifera reticulata* Ducke;
- Avaliação da viabilidade de obtenção de nanocápsulas contendo óleo de *C. multijuga* Hayne;
- Obtenção e caracterização de suspensões de nanocápsulas contendo óleo de *C. reticulata* Ducke;
- Avaliação da influência do tipo polímero na obtenção das suspensões de nanocápsulas contendo óleo de *C. reticulata* Ducke;
- Avaliação preliminar da estabilidade das suspensões de nanocápsulas obtidas;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Copaíba (*Copaifera* sp)

O gênero *Copaifera* L. pertence à família Leguminosae Juss e sub-família Caesalpinoideae Kunth (MACIEL *et al.*, 2002; VEIGA JUNIOR & PINTO, 2002; VEIGA JUNIOR *et al.*, 2005; GARGIA & YAMAGUCHI, 2012). As Leguminosae eram denominadas anteriormente de Fabaceae, essa classificação ainda pode ser encontrada em alguns livros e publicações (SOUSA, 2011_a).

No Brasil as espécies de *Copaifera* são conhecidas, popularmente, como copaíba, copaibeiras, pau d'óleo, copaúba, copaúva, copiúva. São nativas de regiões tropicais da América Latina e também da África Ocidental (GARGIA & YAMAGUCHI, 2012; LEANDRO *et al.*, 2012). Na América Latina são encontradas espécies em regiões que se estendem desde o México até o norte da Argentina (VEIGA JUNIOR & PINTO, 2002; VEIGA JUNIOR *et al.*, 2005).

Seu gênero compreende 72 espécies, existem mais de 20 no Brasil; dessas, 17 são endêmicas, dentre as quais as principais encontradas no país são: *C. officinalis* L. (norte do Amazonas, Roraima, Colômbia, Venezuela e San Salvador), *C. guianensis* Desf. (Guianas), *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne (Amazônia), *C. confertiflora* Bth. (Piauí), *C. langsdorffii* Desf. (Brasil, Argentina e Paraguai), *C. coriacea* Mart. (Bahia) e *C. cearensis* Huber ex Ducke (Ceará) (VEIGA JUNIOR & PINTO, 2002; LEANDRO *et al.*, 2012).

As copaibeiras são árvores de crescimento lento, alcançam de 25 a 40 metros de altura, podendo viver até 400 anos. O tronco é áspero, de coloração escura, medindo de 0,4 a 4 metros de diâmetro. As folhas são alternadas, pecioladas e penuladas. Os frutos contêm uma semente ovóide envolvida por um arilo abundante e colorida. As flores são pequenas, apétalas, hermafroditas e arrançadas em panículos axilares (VEIGA JUNIOR & PINTO, 2002).

A madeira de determinadas espécies do gênero *Copaifera* é utilizada para fabricação de peças torneadas e de marcenaria em geral, fabricação de carvão e pelas indústrias de construção civil e naval (VEIGA JUNIOR & PINTO, 2002).

3.1.1 *Copaifera multijuga* Hayne

C. multijuga Hayne, uma das espécies mais estudada, é encontrada desde o médio Tapajós até a Amazônia Ocidental (Amazonas, Acre e Rondônia). Está presente também, nas regiões sul de Roraima e norte de Mato Grosso. É uma das espécies mais comuns para a extração de óleo de Copaíba (SANT'ANNA *et al.*, 2007; MENDONÇA & ONOFRE, 2009).

A *C. multijuga* Hayne é uma árvore grande, podendo chegar a 36 metros de altura, de copa densa e casca lisa (0,5 cm - 2,0 cm de espessura), fuste reto (diâmetro entre 40 a 50 cm), diferenciando-se das espécies do mesmo gênero pelas flores maiores, brancas e pelo tamanho dos folíolos e dos frutos. Quanto as características físico-químicas, o óleo-resina da *C. multijuga* Hayne é descrito como um líquido transparente, viscoso e fluido, com cheiro forte, sabor acre e amargo, porém sua constituição química tanto quali e quantitativa varia de acordo com a procedência da árvore de copaíba e do tipo de solo (MENDONÇA & ONOFRE, 2009; BARBOSA *et al.*, 2013).

3.1.2 *Copaifera reticulata* Ducke

Ocorre apenas no Brasil, na Amazônia brasileira, foi encontrada amplamente distribuída na porção oriental, rara na ocidental e ausente na nordeste; amplamente distribuída no Pará, encontra-se, ainda, no sudoeste do Amapá, sudeste de Roraima e norte de Mato Grosso. Habita mata de terra firme (MARTINS-DA-SILVA *et al.*, 2008).

3.1.3 Óleo de Copaíba (OC)

A origem do nome copaíba parece vir do tupi cupa-yba, a árvore de depósito, ou que tem jazida, em alusão clara ao óleo que guarda em seu interior (VEIGA JUNIOR &

PINTO, 2002). O óleo de copaíba e suas propriedades medicinais eram muito conhecidos pelos índios latino-americanos que os utilizavam para curar feridas de guerreiros após batalhas e para passar no coto umbilical de recém-nascidos (MACIEL *et al.*, 2002; PIERI *et al.*, 2009).

As propriedades do óleo, tão apreciado pelos índios, fizeram com que a copaíba fosse uma das primeiras espécies a serem descritas pelos cronistas portugueses e acredita-se que sua primeira descrição como cicatrizante e anti-inflamatório date da época do descobrimento (VEIGA JUNIOR & PINTO, 2002).

Segundo VEIGA JUNIOR & PINTO (2002) o óleo de copaíba por ser constituído de ácidos resinosos e compostos voláteis deve ser chamado de óleo-resina.

O óleo-resina pode ser obtido através da perfuração no tronco da copaibeira. São vários os métodos relatados para a extração do óleo de copaíba, sendo o processo ainda artesanal. Antigamente, obtinha-se o óleo através de cortes a machado no tronco, o que inutilizava a árvore. Atualmente, a técnica consiste na perfuração do tronco com um trado de, aproximadamente, 2 metros de diâmetro em dois furos (BARBOSA *et al.*, 2013). O primeiro deve ser feito 1 metro acima da base da planta e o segundo de 1 a 1,5 metros acima do primeiro. Insere-se então um cano de PVC de $\frac{3}{4}$ de polegada nos orifícios, por onde o óleo escoar e reserva-se o óleo. Após a finalização da extração, veda-se o orifício para proteção contra fungos e cupins com o uso de argila ou tampa vedante de plástico sendo ambas de fácil retirada (PIERI *et al.*, 2009).

A incisão no tronco das árvores fornece o óleo de copaíba que é um líquido transparente cuja coloração varia do amarelo ao marrom (SANT'ANNA *et al.*, 2007; LEANDRO *et al.*, 2012). A disseminação da indústria de produtos naturais em todo mundo e no Brasil, nos últimos anos, levou à comercialização extensiva do óleo de copaíba pelos laboratórios farmacêuticos. Os óleos podem ser encontrados nas farmácias de todo o país em diversas apresentações. Porém, é comum a adulteração do óleo de copaíba com produtos de menor valor agregado, com o objetivo de diluir o óleo (VEIGA JUNIOR & PINTO, 2002; BARBOSA *et al.*, 2009). O óleo de copaíba tem representação social e econômico na Região Amazônica, representando

aproximadamente 95% da produção de óleo-resina do país. A produção anual é estimada em 500 mil toneladas/ano (ALMEIDA *et al.*, 2012).

Há dificuldade em realizar um controle botânico do óleo de Copaíba, devido à eventual mistura dos óleos de espécies botânicas variadas, ou ainda de espécies de idades e locais distintos. Também há dificuldade de se proceder à diferenciação morfológica entre as espécies, dada pela dificuldade prática em se obter os órgãos florais das espécies, devido o curto período em que ocorrem e a altura das árvores. Também é relevante ressaltar a importância do estabelecimento de uma normatização química quantitativa para os produtos farmacêuticos formulados com óleo de copaíba, auxiliando no estudo da estabilidade físico-química de formulações e fornecendo suporte ao produto final válido em sua eficácia e segurança (TAPPIN *et al.*, 2004).

3.1.3.1 Propriedades e uso

O óleo de Copaíba é amplamente utilizado na medicina popular através da administração tópica e oral. Ele tem várias indicações etnofarmacológicas, dentre elas: a) para as vias urinárias: como antiblenorrágico, anti-inflamatório, antigonorréico, antisséptico, estimulante e no tratamento de cistite, incontinência urinária e sífilis; b) para as vias respiratórias: antiasmático, expectorante, no tratamento de bronquite, inflamação de garganta, hemoptise, pneumonia e sinusite; c) para infecções da derme e mucosas: como dermatites, eczemas, psoríases e cicatrização de feridas; d) para úlceras e feridas no útero; e) outras finalidades: como afrodisíaco, antitetânico, anti-reumático, anti-herpético, anticancerígeno, antitumoral, cercaricida, dores de cabeça, contra paralisia, picadas de cobra, no tratamento da Leishmaniose e da leucorréia (PACHECO *et al.*, 2006; MENDONÇA & ONOFRE, 2009; PIERI *et al.*, 2009; GARCIA & YAMAGUCHI, 2012).

Além de ser utilizado como produto medicinal, utiliza-se o óleo de copaíba como combustível, na iluminação pública, na indústria de perfumes (como fixador), nas indústrias de cosméticos por suas propriedades emolientes, como bactericida e anti-inflamatório, na manufatura de sabonetes, cremes e espumas de banho, xampus, cremes, condicionadores, loções hidratantes e capilares. Na indústria de vernizes é utilizado

como secativo, na pintura em tela, como “amolecedor” de vernizes e é utilizado como aditivos de alimentos (CASCON & GILBERT 2000; PACHECO *et al.*, 2006; PIERI *et al.*, 2009).

3.1.3.2 Composição Química

Quimicamente, o óleo-resina de copaíba é uma solução de ácidos diterpênicos, em um óleo essencial constituído por sesquiterpenos. O composto sesquiterpeno é dividido em oxigenados e hidrocarbonetos (PIERI *et al.*, 2009). Sendo que os hidrocarbonetos, segundo Maciel *et al.* (2002), possuem maior atividade anti-inflamatória quando comparados aos outros dois grupos presentes. Segundo Leandro *et al.* (2012) no óleo-resina de copaíba, já foram descritos 101 sesquiterpenos e 42 diterpenos.

A composição química dos óleos de copaíba encontra-se definida em vários trabalhos, onde foram utilizadas técnicas mais antigas, bem como metodologias modernas de isolamento e de identificação, tais como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia com fluido super-crítico com detector de infravermelho (SFC-FT-IR), por Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC/DIC) e/ou Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-EM) (VEIGA JUNIOR & PINTO, 2002; LIMA *et al.*, 2011; DIAS *et al.*, 2012).

Muitos estudos têm mostrado que sesquiterpenos são as principais substâncias presentes nas óleo-resinas de copaíba. Por vezes, estes representam mais de 90% da sua composição. Considerando que eles são os componentes principais, muitas das atividades farmacológicas do óleo-resina de copaíba são atribuídas aos sesquiterpenos. No entanto, o efeito farmacológico do óleo-resina não pode ser atribuído a um único constituinte, porque os componentes presentes no óleo podem interagir sinergicamente na promoção da atividade observada. Deve-se levar em conta, também, que o óleo de copaíba não é uma substância pura e sintética e que existem composições e concentrações diferentes de vários componentes (GOMES *et al.*, 2008; BARBOSA, *et al.*, 2012; LEANDRO *et al.*, 2012).

Os principais sesquiterpenos encontrados em óleo de copaíba são: β -cariofileno, óxido de cariofileno, α -humuleno, δ -cadineno, α -cadinol, α -cubebene, α -e β -selineno, β -elemeno, α -copaeno, trans- α -bergamoteno e β -bisaboleno (Figura 1) (LEANDRO *et al.*, 2012).

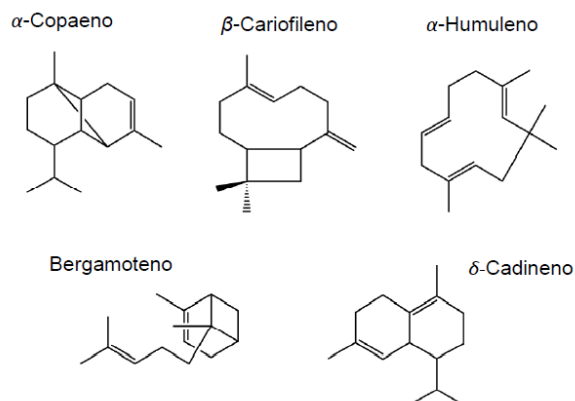


Figura 1 - Principais sesquiterpenos encontrados em óleo de copaíba. Fonte: SOUSA, 2011_a

A indústria de perfumes e cosméticos tem mostrado interesse na fração sesquiterpeno, responsável pelo aroma dos óleos de copaíba. O valor de concentrados de sesquiterpenos de *Copaifera sp.* chegava a ser 600 vezes maior do que o do óleo bruto (VEIGA JUNIOR & PINTO, 2002).

Os diterpenos pertencem aos esqueletos caurano, labdano e clerodano. Em estudo realizado com diversos óleos de copaíba provenientes de várias regiões do Brasil, o ácido copálico foi o único encontrado em todos os óleos analisados. Por esta razão, este diterpeno ácido pode ser usado como biomarcador de óleos de copaíba (VEIGA JUNIOR & PINTO, 2002; GOMES *et al.*, 2008).

Os diterpenos mais comumente encontrados em óleo-resinas de copaíba são ácidos copálico, poliáltico, hardwickiico, caurenóico e ent-caurenóico, juntamente com seus derivados 3-hidroxi-copálico, 3-acetoxi-copálico, e ent-agático (Figura 2) (LEANDRO *et al.*, 2012).

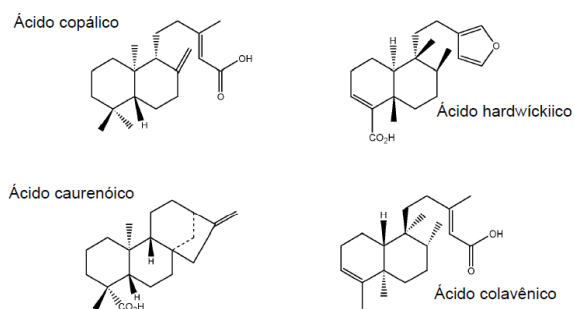


Figura 2 - Principais diterpenos encontrados em óleo de copaíba. Fonte: SOUSA, 2011_a

Alguns autores relacionam a variação na composição dos óleos em função de fatores bióticos externos, tais como a injúria provocada por insetos ou fungos. As variações na composição sesquiterpênica dos óleos são muito grandes, descritas durante a maturação, ocorrendo sazonalmente em uma árvore, numa mesma espécie e entre espécies (CASCON & GILBERT, 2000; VEIGA JUNIOR & PINTO, 2002; BARBOSA *et al.* 2013).

3.1.3.3 Atividades biológicas

Apenas nove espécies de *Copaifera* têm algum estudo biológico descrito na literatura que avalia os usos tradicionais. Em alguns casos, estes estudos não discriminam quais as espécies estão sendo estudadas. Na tabela 1A e 1B estão algumas atividades biológicas e farmacológicas testadas para os óleos de Copaíba de diferentes espécies do gênero:

Espécies	Atividade biológica testada	Referências
<i>C. cearensis</i> Huber ex Ducke	Anti-inflamatória	(FERNANDES <i>et al.</i> , 1992; VEIGA JUNIOR <i>et al.</i> , 2007 _b)
	Antimicrobiana	(SANTOS <i>et al.</i> , 2008 _b)
	Antileishmaniose	(SANTOS <i>et al.</i> , 2008 _a)
<i>C. duckei</i> Dwyer	Analgésica	(CARVALHO <i>et al.</i> , 2005)
	Anti-inflamatória	(CARVALHO <i>et al.</i> , 2005)
	Antimutagênica	(MAISTRO <i>et al.</i> , 2005)
	Antiproliferativa	(CASTO-e-SILVA <i>et al.</i> , 2004)
	Embriotoxicidade	(LIMA <i>et al.</i> , 2011)
<i>C. langsdorffii</i> Desf.	Anti-inflamatória	(PAIVA <i>et al.</i> , 2003, 2004 _b ; VIRIATO <i>et al.</i> , 2009)
	Antileishmaniose	(SANTOS <i>et al.</i> , 2008 _a)
	Antimicrobiana	(OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2007; SANTOS <i>et al.</i> , 2008 _b ; PIERI <i>et al.</i> , 2010 _a , 2011, 2012)
	Antioxidante	(MACIEL & GOUVEA, 2007)
	Antitumoral	(OHSAKI <i>et al.</i> , 1994)
	Atenuação da isquemia /reperusão intestinal induzida	(PAIVA <i>et al.</i> , 2004 _a)
	Cicatrização de ferida	(PAIVA <i>et al.</i> , 2002; VIERA <i>et al.</i> , 2008; ESTEVÃO <i>et al.</i> , 2009)
	Efeito gastroprotetor em modelos experimentais de úlcera gástrica	(PAIVA <i>et al.</i> , 1998)
	Genotoxicidade	(CAVALCANTI, 2006)
	Isquemia-reperusão de retalhos cutâneos randomizados	(SILVA <i>et al.</i> , 2009)
	Inseticida	(MENDONÇA <i>et al.</i> , 2005)
Tratamento endometriose	(NOGUEIRA-NETO <i>et al.</i> , 2011)	
<i>C. lucens</i> Dwyer	Antimicrobiana	(SANTOS <i>et al.</i> , 2008 _b)
	Antileishmaniose	(SANTOS <i>et al.</i> , 2008 _a)
<i>C. martii</i> Hayne	Antileishmaniose	(SANTOS <i>et al.</i> , 2008 _a , 2011)
	Antimicrobiana	(SANTOS <i>et al.</i> , 2008 _b)
<i>C. multijuga</i> Hayne	Anti-inflamatória	(BRITO <i>et al.</i> , 2005; VEIGA JUNIOR <i>et al.</i> , 2006, 2007 _b ; GOMES <i>et al.</i> , 2010)
	Antinociceptiva	(GOMES <i>et al.</i> , 2007, 2010)
	Anti-isquemia	(BRITO <i>et al.</i> , 2005)
	Antileishmaniose	(SANTOS <i>et al.</i> , 2008 _a)
	Antimicrobiana	(SANTOS <i>et al.</i> , 2008 _b ; MENDONÇA & ONOFRE, 2009; PACHECO <i>et al.</i> , 2006; DEUS <i>et al.</i> , 2009, 2011)
	Antitumoral	(VEIGA JUNIOR & PINTO, 2002; LIMA <i>et al.</i> , 2003; GOMES <i>et al.</i> , 2008)
	Inseticida	(KANIS <i>et al.</i> , 2012)
Larvicida	(TRINDADE <i>et al.</i> , 2013)	
<i>C. officinalis</i> (Jacq.) L.	Anti-isquemia	(ARAUJO <i>et al.</i> , 2005)
	Antileishmaniose	(SANTOS <i>et al.</i> , 2008 _a , 2013)
	Antimicrobiana	(SANTOS <i>et al.</i> , 2008 _b ; PIERI <i>et al.</i> , 2010 _b , 2011, 2012; SANTOS <i>et al.</i> , 2012 _a)
	Antitumoral	(BRITO <i>et al.</i> , 2010)

Tabela 1A – Espécies de óleo-resina de *Copaifera* testadas em diferentes atividades biológicas.

Espécies	Atividade biológica testada	Referências
<i>C. paupera</i> (Herzog) Dwyer	Antimicrobiana	(SANTOS <i>et al.</i> , 2008 _b)
	Antileishmaniose	(SANTOS <i>et al.</i> , 2008 _a)
<i>C. reticulata</i> Ducke	Anti-inflamatória	(VEIGA JUNIOR <i>et al.</i> , 2007 _b)
	Ansiolítico	(CURIO <i>et al.</i> , 2009)
	Antinociceptiva	(GOMES <i>et al.</i> , 2007)
	Antileishmaniose	(SANTOS <i>et al.</i> , 2008 _a , 2012 _b)
	Antimicrobiana	(CORREIA <i>et al.</i> , 2008; SANTOS <i>et al.</i> , 2008 _b)
		(VEIGA JUNIOR & PINTO, 2002)
	Antioxidante	(BRITO, <i>et al.</i> , 1998, 1999)
	Cicatrização de feridas	(SILVA <i>et al.</i> , 2003; FERNANDES & FREITAS, 2007; SILVA <i>et al.</i> , 2007; GERIS <i>et al.</i> , 2008; KANIS <i>et al.</i> , 2012)
	Inseticida	(SACHETTI <i>et al.</i> , 2011)
Teratogenicidade e embriotoxicidade	(SACHETTI <i>et al.</i> , 2009)	
Toxicidade	(SACHETTI <i>et al.</i> , 2009)	
<i>C. sp.</i> (comercial óleo-resina de Copaíba)	Anti-inflamatória	(BASILE <i>et al.</i> , 1988; VEIGA JUNIOR <i>et al.</i> , 2001)
	Antimicrobiana	(LIMA <i>et al.</i> , 2006)
	Genotoxicidade	(ALMEIDA <i>et al.</i> , 2012)
	Inseticida	(PROPHIRO, 2012 _a , 2012 _b)
	Perfusão na pele	(OLIVEIRA, <i>et al.</i> , 2010)

Tabela 1B - Espécies de óleo-resina de *Copaifera* testadas em diferentes atividades biológicas. Modificada de Leandro et al., 2012

Entre as propriedades medicinais do óleo de copaíba, a mais estudada foi a anti-inflamatória. O primeiro estudo foi realizado por Basile et al. (1988) onde avaliaram a atividade do óleo de copaíba comercial, utilizando diversos modelos em ratos. Houve inibição de edema induzido por carragenina, redução da formação de granuloma e diminuição da permeabilidade vascular ocasionada pela liberação intradérmica de histamina. Os resultados alcançados indicam que o óleo possui atividade anti-inflamatória e baixa toxicidade. Esse estudo foi posteriormente confirmado por Veiga Junior et al. (2001), no qual foi mostrado, também, que a atividade varia com óleos-resinas de copaíba provenientes de espécies diferentes e utilizando diferentes agentes flogísticos.

O óleo de copaíba (*C. langsdorffii*) possui a capacidade de reduzir o tempo de reparação tecidual em feridas cutâneas em ratos (PAIVA *et al.*, 2002), além de possuir propriedades anti-inflamatórias e analgésicas (FERNANDES *et al.*, 1992).

Conforme, Carvalho et al. (2005) o óleo-resina *C. duckei* Dwyer demonstrou efeito anti-edematogênico observado em edema de pata de ratos induzida por

carragenina. Veiga Junior et al. (2006) avaliaram e confirmaram que o óleo-resina bruto de *C. multijuga* Hayne e suas frações (hexano, diclorometano e metanol) possuem propriedades anti-inflamatórias contra formação de edema na pata de rato induzido por carragenina e bradicinina.

Ramos (2006) desenvolveu microcápsulas contendo a fração volátil de copaíba por *spray-drying*. Como resultados encontraram que a fração microencapsulada inibiu a resposta inflamatória na mesma magnitude que a fração volátil livre, mostrando que o processo de microencapsulação não alterou a atividade, possibilitando seu uso como forma farmacêutica ou intermediária na preparação de outras. O β -cariofileno inibiu a resposta inflamatória na mesma magnitude que a fração volátil, o que permitiu atribuir a este, a atividade anti-inflamatória observada.

Os óleos das espécies de *C. multijuga* Hayne, *C. cearenses* Huber ex Ducke e *C. reticulata* Ducke foram comparados quanto à atividade anti-inflamatória através da avaliação da reação sob a cavidade pleural induzida por Zimosan. As três espécies apresentaram diminuição do número de leucócitos e neutrófilos, além de inibirem a produção de óxido nítrico. A *C. multijuga* Hayne foi a mais potente (VEIGA JUNIOR et al., 2007).

Viriato et al. (2009), comprovaram o efeito inibitório do edema, quando o óleo de copaíba foi testado em alta diluição. Os resultados sugerem que o mecanismo envolvido interfere na atividade da ciclooxigenase, enzima produtora de importantes mediadores da inflamação. Gomes et al. (2010) sugerem que óleo-resina de *C. multijuga* Hayne tem atividade anti-inflamatória por inibir a histamina e as vias da serotonina.

Segundo Leandro et al. (2012) o óleo-resina de copaíba possui vários trabalhos que têm avaliado a sua atividade antimicrobiana frente a várias bactérias e fungos, dentre eles: *Escherichia coli* (MENDONÇA & ONOFRE, 2009; PIERI et al., 2010_a), *Staphylococcus aureus* (PACHECO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007; CORREIA et al., 2008; SANTOS et al., 2008_b; MENDONÇA & ONOFRE, 2009; PIERI et al., 2012), *S. aureus* metilicina resistente (SANTOS et al., 2008_b), *Aspergillus flavus* (DEUS et al., 2009, 2011), *A. niger* (DEUS et al., 2009, 2011), *Trichophyton rubrum* (SANTOS et al., 2008_b).

Já no processo de cicatrização, Brito (1996) apud Estevão et al. (2009, p. 408) estudou os aspectos morfológicos e morfométricos do processo cicatricial de feridas cutâneas abertas em ratos tratados com óleo de copaíba (*Copaifera reticulata*) e observou aumento da crosta da lesão, do tecido de granulação e do número de vasos sanguíneos, com diminuição do número de fibras colágenas. De acordo com Estevão et al. (2009), a formulação de uma pomada contendo 10% de óleo de copaíba levou a maior angiogênese nas regiões média e caudal de retalho cutâneo em ratos, favorecendo a reparação tecidual.

3.1.3.4 Atividades biológicas dos principais sesquiterpenos e diterpenos

Vários dos compostos isolados ou detectados nos óleos de copaíba já tiveram propriedades farmacológicas, descritas na literatura. Entre os sesquiterpenos, algumas propriedades como antiúlcera, antiviral e anti-rinovírus são descritas para o arcurcumeno e o β -bisaboleno, este último também descrito como abortivo (LEANDRO *et al.*, 2012). O bisabolol é conhecido por conferir as propriedades anti-inflamatória e analgésica à camomila (*Matricaria chamomilla*), o β -elemeno é descrito como um agente anti-tumoral de largo espectro (eficaz para vários tipos de câncer) e o δ -cadineno como anticariogênicos e bactericida (VEIGA JUNIOR & PINTO, 2002; CAVALCANTI *et al.*, 2006; GOMES *et al.*, 2008; LEANDRO *et al.*, 2012).

Os sesquiterpenos β -cariofileno e seu óxido são comumente encontrados em óleo-resina de copaíba e em muitas outras espécies de plantas. Cascon & Gilbert (2000) sugeriram que o óxido de cariofileno é um produto genuíno do metabolismo secundário de *Copaifera* e não um artefato, resultante de armazenamento como se acreditava. O β -cariofileno, é geralmente o principal constituinte do óleo de copaíba e tem sido considerado um marcador químico desses óleos, porém alguns estudos mais recentes demonstram a presença traço ou até mesmo ausência desse composto em alguns óleos resinas identificados e comercializados como proveniente de *Copaifera sp.*, colocando em dúvida a autenticidade do óleo, ou seja, se o fato da ausência desse elemento trata-se de questão de adulteração ou variabilidade sazonal da espécie oriunda do óleo (BARBOSA *et al.*, 2012). Várias atividades biológicas são atribuídas ao β -cariofileno, tais como atividades anti-inflamatória, antimicrobiana, inseticida, anti-edêmico,

antitumoral, anestésico local, anticarcinogênico (SANTOS, *et al.*, 2008_a; VIRIATO *et al.*, 2009, DIAS *et al.*, 2012; LEANDRO *et al.*, 2012).

Segundo Leandro *et al.* (2012), dentre os diterpenos, o ácido copálico e o ácido hardwickiico têm mostrado atividade antimicrobiana; ácido kaurano tem demonstrado atividades anti-inflamatórias, bactericida, efeitos citotóxicos, atividade contra tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, indução de genotoxicidade, efeitos vasodilatadores e relaxante muscular uterino. O 3 α -hidroxi-caurenóico ácido apresentou atividade fungitóxica. Atividade larvicida também tem sido relatada contra larvas de *A. aegypti*, através do ácido (-)-3 β -hidroxilabd-8(17)-13-dien-15-óico e 3- β -acetoxylabd-8(17)-13-dien-15-óico.

O ácido caurenóico é descrito na literatura como tripanossomicida, atividade relaxante do músculo liso sobre contrações uterinas induzidas, atividades *in vitro* antiparasitárias, antimicrobiana, ação antiproliferativa em culturas de células tumorais e efeito hemolítico contra eritrócitos humano e de rato e quando testado no espermatozoide humano, redução da motilidade, mas foi apenas fracamente espermicida (VEIGA JUNIOR & PINTO, 2002; CAVALCANTI *et al.*, 2006; GOMES *et al.*, 2008; LEANDRO *et al.*, 2012).

3.2 Nanotecnologia e nanopartículas poliméricas

A nanotecnologia é um campo científico multidisciplinar que tem avançado rapidamente nos últimos anos, encontrando aplicações nas mais diversas áreas, desde setores de energia e eletrônica até a indústria farmacêutica. O princípio dessa ciência é que os materiais na escala nanométrica podem apresentar propriedades químicas, físico-químicas e comportamentais diferentes daquelas apresentadas em escalas maiores (DURAN *et al.*, 2006).

Na área da saúde, a *European Medicines Agency* define a nanotecnologia como o uso de pequenas estruturas menores de 1.000 nanômetros de diâmetro que são projetadas para apresentar propriedades específicas. Particularmente, nas áreas de nanotecnologia farmacêutica e de nanomedicina, os esforços em pesquisa e desenvolvimento (P&D) visam, principalmente, projetar nanomedicamentos para

oferecerem vantagens em relação aos seus homólogos na forma *bulk*, principalmente pelo seu tamanho reduzido, ou seja, um aumento na área de superfície em relação ao seu volume (DIMER *et al.*, 2013).

Inúmeros trabalhos científicos descrevem os benefícios da nanotecnologia na terapêutica. A maior parte dos estudos tem sido focada no desenvolvimento de formulações nanotecnológicas destinadas ao tratamento do câncer, de doenças inflamatórias, cardiovasculares, neurológicas e ao combate do vírus da imunodeficiência adquirida (AIDS). Na atualidade, existem mais de uma centena de estudos clínicos com nanomedicamentos em andamento, sendo que a doença-alvo mais recorrente é o câncer de mama. As nanopartículas mais estudadas são as de albumina e o fármaco mais empregado é o paclitaxel (DIMER *et al.*, 2013).

Nanocarreadores estão sendo extensivamente estudados para a liberação de fármacos no campo da Tecnologia Farmacêutica, bem como, nas diferentes áreas de nanociências. Em geral, alguns nanocarreadores promissores são os lipossomas, as nanopartículas lipídicas sólidas, as micelas e nanopartículas poliméricas (JÄGER *et al.*, 2007). Têm-se aumentado o interesse na utilização de nanopartículas (LETCHFORD & BURT, 2007).

As nanopartículas poliméricas, constituídas por polímeros biodegradáveis, são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a 1 μm , e substâncias podem ser encapsuladas, adsorvidas ou dispersas nas mesmas. O termo nanopartícula inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural. As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Entretanto, as nanoesferas não apresentam óleo em sua composição e são formadas por um núcleo sólido formado por uma rede polimérica sendo caracterizadas pela presença de uma estrutura matricial, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (SOPPIMATH *et al.*, 2001; COUVREUR *et al.*, 2002; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; LETCHFORD & BURT, 2007; MELO *et al.*, 2012; PARVEEN *et al.*, 2012).

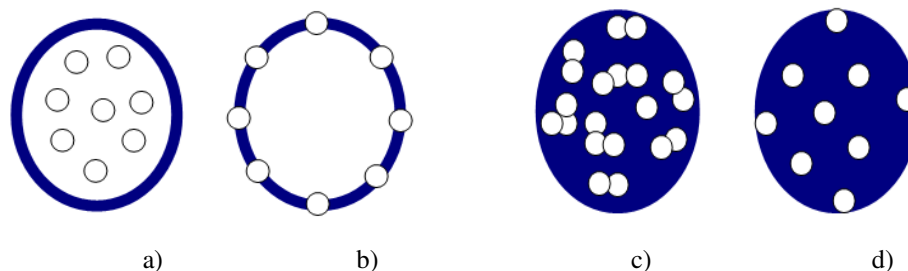


Figura 3 - Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas. Adaptado de SCHAFFAZICK et al., 2003

Estes sistemas têm sido desenvolvidos visando inúmeras aplicações terapêuticas, sendo planejados principalmente para administração parenteral, oral ou oftálmica. Uma das áreas mais promissoras na utilização das nanopartículas é a vetorização de fármacos anticancerígenos e de antibióticos principalmente através de administração parenteral, almejando uma distribuição mais seletiva dos mesmos e, assim, um aumento do índice terapêutico. Com relação à administração oral de nanopartículas, as pesquisas têm sido direcionadas especialmente à: a) diminuição dos efeitos colaterais de certos fármacos, destacando-se os anti-inflamatórios não-esteróides, os quais causam freqüentemente irritação à mucosa gastrointestinal e b) proteção de fármacos degradáveis no trato gastrointestinal, como peptídeos, proteínas e/ou hormônios, aumentando a biodisponibilidade dos mesmos. Outro grande interesse nas nanopartículas é sua administração oftálmica, visando o controle da liberação, o aumento da biodisponibilidade ocular e/ou a diminuição dos efeitos colaterais devido à absorção sistêmica de certos fármacos (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

As nanocápsulas apresentam uma série de vantagens em relação a outros sistemas carreadores e emulsões, devido às suas potencialidades terapêuticas, tais como: melhorar a eficácia e a biodisponibilidade de fármacos, reduzir efeitos secundários e, ainda, conferir proteção da substância ativa nela incorporada frente à degradação química (JÄGER *et al.*, 2007). Além do mais, as nanopartículas podem ser usadas para liberação de fármacos direcionados (tecido/celular), para melhorar a biodisponibilidade oral, para sustentar o efeito do fármaco/gene no tecido-alvo e para solubilizar fármacos para liberação intravascular (PANYAM & LABHASETWAR, 2012).

3.2.1 Métodos de obtenção

Existem vários métodos relatados na literatura para a preparação de nanopartículas poliméricas, os quais podem ser de uma forma geral, classificados em métodos baseados na polimerização *in situ* de monômeros dispersos (cianoacrilato de alquila) ou na precipitação de polímeros pré-formados, tais como poli (ácido lático) (PLA), poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), poli (ϵ -caprolactona) (PCL) e, ainda, os copolímeros do ácido metacrílico e de um éster acrílico ou metacrílico (SOPPIMATH *et al.*, 2001; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; GUTERRES *et al.*, 2007).

A polimerização de cianoacrilatos de alquila em emulsão conduz a nanopartículas matriciais chamadas nanoesferas, enquanto a adição de um solvente orgânico e um óleo nesse meio origina nanoestruturas vesiculares chamadas de nanocápsulas, por polimerização interfacial. Além disso, nanoesferas podem ser igualmente preparadas utilizando polímeros pré-formados por nanoprecipitação (omitindo o óleo na formulação), e as nanocápsulas por deposição interfacial do polímero (contendo o óleo). O método de emulsificação-difusão foi também introduzido para obter nanocápsulas, sendo capaz de produzir nanoesferas omitindo o óleo nas formulações. As nanopartículas podem também ser preparadas usando um método de extração com solvente, em que a emulsão O/A é homogeneizada a alta velocidade seguido de adição de água e evaporação do solvente (GUTERRES *et al.*, 2007).

Fessi *et al.* (1989) propuseram o método baseado na deposição do polímero pré-formado biodegradável. Este método não apresenta os inconvenientes da presença de monômeros e oligômeros residuais, consequência da polimerização “*in situ*” e a possibilidade de reação cruzada entre o monômero acrílico e o fármaco. O polímero é dissolvido em um solvente orgânico (como a acetona e o etanol) juntamente com o óleo, o tensoativo lipofílico e o fármaco a encapsular. A fase oleosa é vertida, sobre a fase aquosa, a qual é composta de água e tensoativo hidrofílico. Esta mistura origina, espontaneamente, as nanocápsulas, com diâmetro médio entre 200 a 500 nm (Figura 4). As nanocápsulas obtidas por esta metodologia são estáveis e, além disso, fornecem elevadas taxas de encapsulação, principalmente para fármacos lipofílicos (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; GUTERRES *et al.*, 2007).

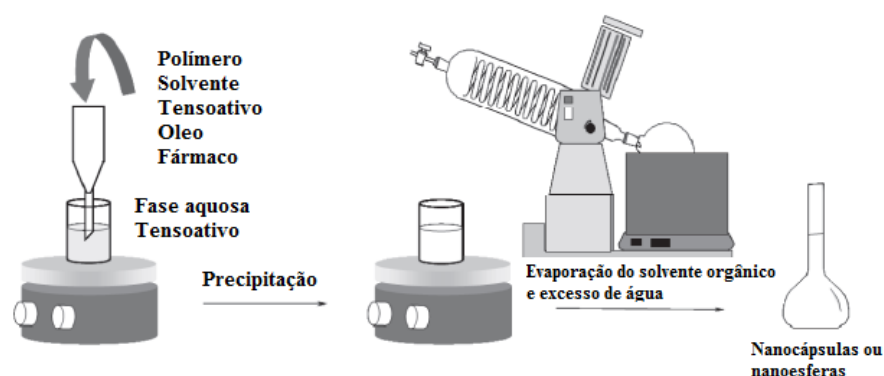


Figura 4 – Representação esquemática de preparação de nanocápsulas obtidas pelo método deposição de polímero pré-formado. Adaptado de: GUTERRES *et al.*, 2007

A nanoprecipitação parece ser um processo bastante simples, no entanto, seu mecanismo não está completamente esclarecido, podendo envolver um fenômeno hidrodinâmico interfacial complexo. A adição da fase orgânica sobre a aquosa ocasiona uma emulsificação espontânea da fase oleosa, em gotículas de diâmetro nanométrico. O solvente difunde-se no não solvente e o polímero que é insolúvel, tanto no não solvente quanto no núcleo oleoso, é dissolvido na interface destes dois componentes imiscíveis, onde se deposita formando a membrana das nanocápsulas. Este método demonstra a propriedade do polímero em atuar como barreira e estabilizar a emulsão formada pelo material central. Assim, o mecanismo de formação das nanocápsulas pode ser explicado pela turbulência interfacial ou agitação espontânea da interface entre duas fases líquidas em desequilíbrio envolvendo o processo de difusão (FESSI *et al.*, 1989; ANGELI, 2007; MORAES *et al.*, 2009).

O método de nanoprecipitação é rápido e relativamente simples de ser executado, reprodutível e aplicável a muitos polímeros, não requer homogeneização de alta energia e é facilmente escalonável (MELO *et al.*, 2012). As limitações incluem a necessidade do emprego de solventes miscíveis em água (em que a razão de difusão é suficiente para a produção espontânea da emulsão), a solubilidade das substâncias empregadas (devem ser lipossolúveis), a quantidade significativa de solvente orgânico utilizado e a dificuldade de escolha do sistema fármaco/polímero/solvente/não-solvente, em que as partículas possam ser formadas e a substância ativa eficientemente encapsulada (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998; DOMINGUES, 2006).

Para a obtenção de nanocápsulas através do método de deposição interfacial de um polímero pré-formado, as matérias-primas imprescindíveis são o polímero biodegradável, o componente oleoso e os tensoativos (FESSI *et al.*, 1989; ANGELI, 2007).

O componente oleoso é de extrema importância já que é nele que ocorrerá a solubilização da substância que se pretende encapsular, sendo que a lipossolubilidade da substância ativa neste meio é um fator importante para a encapsulação. Os óleos mais usados são os ésteres etílicos de ácidos graxos saturados, misturas de triglicerídeos de ácidos graxos saturados de cadeia longa e Miglyol 810[®] e 812[®] (FESSI *et al.*, 1989). Estas formulações requerem também o uso de uma associação de tensoativos, um de elevado EHL (Symperonic PEF 80[®] ou Tween 80) e outro de baixo EHL (monoestearato de sorbitano ou Epikuron 170[®]). A presença dos tensoativos confere maior viscosidade ao sistema após a evaporação do solvente, aumentando a estabilidade do mesmo por prevenir a coeservação e a agregação com o passar do tempo (ANGELI, 2007).

A utilização de materiais poliméricos para a encapsulação de fármacos ou ativos cosméticos é uma alternativa interessante para mascarar as propriedades físico-químicas intrínsecas da substância, melhorar sua interação com membranas e facilitar sua absorção ou penetração cutânea (GUTERRES *et al.*, 2007). Poli (D,L-lático-co-glicólico) (PLGA), poli ácido (D,L-lático) (PLA) e poli (ϵ -caprolactona) (PCL) são polímeros amplamente utilizados na preparação de nanocápsulas (PARVEEN *et al.*, 2012). A degradação destes polímeros *in vivo* produz monômeros biocompatíveis e toxicologicamente seguros, com a sua via de metabolização estabelecida (MELO *et al.*, 2012). Dentre os polímeros utilizados a poli- ϵ -caprolactona destaca-se devido sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades mecânicas, pois é um polímero semi-cristalino que apresenta degradação mais lenta quando comparado aos polímeros amorfos (GUTERRES *et al.*, 2007).

3.2.2 Caracterização das suspensões de nanocápsulas (NC)

As NCs podem ser caracterizadas pela combinação de diversas técnicas: a análise morfológica, distribuição do tamanho das partículas, determinação do potencial zeta, pH e a determinação da concentração de fármaco associado às nanoestruturas, dentre outras (SCHAFFAZICH *et al.*, 2003).

A determinação da distribuição do tamanho de partícula é uma das avaliações mais importantes das suspensões coloidais, uma vez que a tendência à sedimentação durante armazenagem pode ser monitorada por este parâmetro. Além disso, valores reduzidos de diâmetro de partícula são fundamentais para a absorção e distribuição *in vivo* das suspensões coloidais (ANGELI, 2007).

A medição do potencial zeta é uma das técnicas mais utilizada para caracterizar as superfícies de nanopartículas. O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso da dispersão (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Valores do potencial zeta acima de 30 (valores negativos ou positivos) conduzem a suspensões de nanocápsulas mais estáveis devido a repulsão entre as partículas previnem sua agregação (COUVREUR *et al.*, 2002).

Os fosfolipídeos (lecitinas), os poloxamers (copolímeros dos óxidos de etileno e de propileno) e os polímeros constituintes das nanopartículas são os principais componentes presentes nas formulações capazes de influenciar o potencial zeta. Especialmente os poliésteres como o PLA, e as lecitinas fornecem um potencial negativo à interface, enquanto que, os poloxamers (tensoativos não-iônicos) tendem a reduzir o valor absoluto deste parâmetro. Em módulo, um valor de potencial zeta relativamente alto é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Informações relevantes sobre a estabilidade de suspensões nanoparticuladas podem ser obtidas mediante o monitoramento do pH em função do tempo. Por exemplo, a alteração do pH pode ser indício de degradação do polímero ou outros componentes da formulação (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

A diminuição dos valores de pH de suspensões coloidais poliméricas, em um curto período de tempo, pode ser atribuída tanto à ionização de grupos carboxílicos presentes no polímero, quanto a hidrólise, dependendo da hidrofobicidade do poliéster. Suspensões de nanopartículas preparadas com PCL apresentam redução dos valores de pH num período de 3 a 5 meses. Este fato foi atribuído à exposição de maior número de grupos carboxilas terminais, em função do tempo, promovida pela relaxação das cadeias poliméricas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

A avaliação da quantidade de substância ativa presente nas nanopartículas é fundamental, porém complicada, devido à dificuldade em separar a substância ativa livre da associada, em função da natureza coloidal das suspensões. O conteúdo de substância ativa no interior das nanocápsulas é determinado em função da diferença entre o total de substância ativa contida na suspensão e a quantidade de fármaco livre na suspensão, a qual é determinada após a separação das fases por ultrafiltração-centrifugação (FESSI *et al.*, 1989; ANGELI, 2007).

4 METODOLOGIA

- Materiais e Reagentes

- Acetona P.A (Dinâmica Química Contemporânea Ltda.)
- Acetato de Etila Grau HPLC (Tédia[®], USA)
- Acetonitrila Grau HPLC (Merck[®])
- Água destilada
- Dispositivo de ultracentrifugação Amicon Ultra 0,5, membrana de celulose regenerada 100000 Daltons (Millipore[®], Bedford, USA)
- Membrana 0,45 µm (Millipore[®], Bedford, USA)
- Monolaurato de polioxietileno sorbitano – Tween 80[®] (Sigma Aldrich Chem. Co.)
- Monoestearato de Sorbitano - Span 60[®] (Sigma Aldrich Chem. Co.)
- Padrão Ácido Caurenóico (Sigma Aldrich Chem. Co., Lote 122228134V)
- Poli (D, L - ácido lático-co-glicólico) (PLGA) (85:15) – MM 50.000-75000 (Sigma Aldrich Chem. Co.)
- Poli-ε-caprolactona (PCL) – MM 70.000-90.000 (Sigma Aldrich Chem. Co.)
- Tampão pH 4,00 e 7,00

- Equipamentos

- Agitador magnético e aquecedor (Nova Ética, Modelo: 114)
- Balança analítica (Shimadzu, Modelo AY 220)
- Centrífuga (HT, Modelo MCD-2000) até 10.000 RPM
- Coluna Cromatográfica C18 Phenomenex (250x4,60 nm com 5 µm com pré-coluna de mesmo material)
- Cromatógrafo Gasoso (Agilent Technologies, Modelo 6890N acoplado a detector de ionização de chamas)
- Cromatógrafo Gasoso (Shimadzu, Modelo QP2010 equipado com injetor automático AOC-20SI)
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC) (Thermo Scientific, Modelo Ultimate 3000 com detector de UV-vis)

- Microscópico de força atômica (Shimadzu, Modelo: SPM-9600)
- Multivapor rotatório (Buchi, Modelo: P-6)
- Potenciômetro (Hanna, Modelo: pH 21)
- Ultrassom (Cleaner, Modelo: USC 1400)
- Viscosímetro Rotacional (Brookfield, Modelo:LV DV-II + Pro)
- Zetasizer[®] (Malvern, Modelo: Nano SZ)

4.1 Obtenção do óleo de Copaíba (*C. multijuga* Hayne e *C. reticulata* Ducke)

Óleos de seis árvores individuais de *C. multijuga* Hayne foram coletados na Reserva Florestal Adolpho Ducke, localizada em Manaus, Amazonas, Brasil. Sendo:

- 1 óleo foi fornecido pelo Q-BIOMA (Grupo de pesquisa do professor Valdir Florêncio Veiga Júnior da ICE – UFAM) com coleta datada de junho de 2012. No decorrer do trabalho esse óleo foi identificado pela sigla OCM 5.

- 5 óleos foram coletados no mês de outubro de 2013, com o auxílio de um mateiro do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). No decorrer do trabalho esses óleos foram identificados pelas siglas OCM 1, OCM 2, OCM 3, OCM 4 e OCM 7. Cada um desses óleos foi retirado de árvores distintas, localizadas em diferentes áreas da reserva. Os óleos OCM 1, OCM 2, OCM 3, OCM 4 foram oriundos de árvores presentes em solos arenosos e o óleo OCM 7 foi oriundo de árvore de solo argiloso.

As amostras foram coletadas a partir de extração direta, através de perfuração do tronco com um trado de metal, aproximadamente 1 metro acima do solo. Inseriu-se então um cano de PVC no orifício, por onde o óleo escoou e reservou-se o óleo. Após a finalização da extração vedou-se o orifício.

O óleo de *C. reticulata* Ducke foi fornecido pelo Q-BIOMA (Grupo de pesquisa do professor Valdir Florêncio Veiga Júnior da ICE – UFAM). O óleo foi coletado na Floresta Nacional do Tapajós, no Estado do Pará, nas áreas Km 67 da BR-163 (Santarém-Cuiabá), no período de fevereiro a junho de 2009.

4.2 Caracterização físico-química do OC

A caracterização do OC foi realizada no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas (FCF-UFAM). Foram caracterizados quanto as suas propriedades físico-químicas, através da determinação dos ensaios descritos abaixo:

4.2.1 Densidade relativa (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010)

Foi utilizado picnômetro limpo e seco, com capacidade de 25 mL, previamente calibrado. A calibração consistiu na determinação da massa do picnômetro vazio e da massa de seu conteúdo com água, recentemente destilada e fervida, a 25 °C. O óleo de Copaíba foi transferido para o picnômetro, removeu-se o excesso do óleo, quando necessário, e pesou-se o conjunto. O peso da amostra do óleo foi obtido através da diferença de massa do picnômetro cheio e vazio. A densidade relativa foi calculada determinando a razão entre a massa do óleo e a massa da água, ambas a 25 °C. A densidade foi expressa pela média e desvio-padrão de três determinações.

4.2.2 Índice de refração

O experimento foi realizado em triplicata, empregando-se o refratômetro digital *Hand-Hend*, onde o equipamento foi aferido previamente com água destilada, a 25 °C, cujo índice de refração é 1,3330. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, cerca de 0,2 mL de amostra foi colocada no local adequado do equipamento e espalhada uniformemente. A refringência de cada amostra foi medida de acordo com a escala interna do equipamento e expressa pela média e desvio padrão de 3 determinações.

4.2.3 Viscosidade

Foi realizada com auxílio de viscosímetro rotacional de Brookfield, utilizando adaptador para pequenas amostras com *spindle* SC4-18. As análises reológicas foram obtidas a uma temperatura de 25°C com variação da velocidade de 0 a 130 RPM (curva ascendente) e de 130 a 0 RPM (curva descendente), com um tempo de 30 segundos e leitura de 30 pontos. O equipamento forneceu os dados de tensão de cisalhamento e taxa de deformação através do *software* Brookfiel Rheocalc versão 3.2

4.2.4 Análises Cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas no Laboratório de Farmacognosia, Laboratório de Química Orgânica e Laboratório de Espectrometria de Massas Aplicado a Química de Produtos Naturais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto (USP- FCFRP).

4.2.4.1 *Cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de ionização de chama (CG/DIC)* (SOUSA *et al.*, 2011_b)

As amostras de óleo (1 mg) foram diluídas em 1 mL de acetato de etila, obtendo uma concentração final de 1mg/mL. 1 µL da alíquota foi injetado no sistema CG. A análise foi efetuada no equipamento CG Agilent Technologies, equipado com injetor split/splitless e um detector de ionização de chama (DIC). A coluna capilar de sílica fundida HP - 5 (30 m comprimento e diâmetro interno de 0.32 mm) revestida com 5% de fenil–metil-siloxano (0,25 µm de espessura de filme) foi utilizada para este estudo. Hidrogênio foi empregado como gás de arraste com fluxo de 2,0 mL/min. A temperatura do forno do CG foi programada 100-140°C a 10°C/min, 140-180°C a 2,5°C/min e 180-280°C a 20 °C/min, a finalização a análise cromatográfica em 21 min. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas a 240 e 280°C, respectivamente. O injetor foi operado em um modo split 80:1.

4.2.4.2 *Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM)* (SOUSA *et al.*, 2011_b)

A caracterização química das amostras de óleo foi realizada por CG-EM. O cromatógrafo utilizado foi da marca Shimadzu (modelo QP2010) utilizado sob condições semelhantes aos descritos para o CG-DIC. Todos os espectros de massa foram registrados no modo impacto eletrônico a 70 eV (40-500m/z).

Os compostos analisados por cromatografia em fase gasosa foram identificados por comparação dos espectros de massa com os da espectroteca Wiley 7.0 e pelo cálculo

dos índices de retenção (IR) (IR em relação ao *n*-alcanos C₉-C₂₂) e por comparação com os índices disponíveis na literatura.

4.3 Obtenção das NCs de OC

A obtenção e caracterização das nanocápsulas foram realizadas no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e Laboratório de Produtos Naturais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas (FCF-UFAM).

4.3.1 Obtenção das NCs de OC – Estudo piloto com óleo de *C. multijuga* Hayne

No estudo piloto foi utilizado o óleo OCM 5 fornecido pelo Q-BIOMA. As NCs contendo óleo de copaíba foram preparadas de acordo com o método de deposição interfacial de polímero pré-formado (FESSI *et al.*, 1989). Como formulação inicial, foram utilizados os componentes e concentrações descritos abaixo:

- Fase orgânica: Óleo de copaíba..... 1 mL
 - Span 60®.....191,5 mg
 - PCL.....250,0 mg
 - Acetona..... 130 mL
- Fase aquosa: Tween 80®191,5 mg
 - Água destilada.....133,5 mL

O polímero foi pesado e colocado em um béquer com acetona e mantidos sob agitação magnética a uma temperatura de 40 °C até completa dissolução. Posteriormente, foi acrescentado o Span 60® e após a solubilização deste, acrescentou-se o óleo, mantendo-se a agitação magnética. A fase orgânica foi vertida sobre a fase aquosa (contendo água e Tween 80®), com auxílio de um funil, e mantida sob agitação magnética moderada por 15 minutos. A suspensão foi concentrada a um volume final de 40 mL em um multivaporador rotatório para eliminação do solvente orgânico.

4.3.2 Obtenção das NCs de óleo *C. reticulata* Ducke

As NCs contendo óleo de *C. reticulata* Ducke foram preparadas de acordo com o método de deposição interfacial de polímero pré-formado (FESSI *et al.*, 1989). Como formulação, foram utilizados os componentes e concentrações descritos abaixo (modificado de LOBATO *et al.*, 2013):

- Fase orgânica: Óleo de copaíba..... 1 ou 2 mL
 - Span 60®.....150 mg
 - PCL ou PLGA.....250 mg
 - Acetona..... 100 mL
- Fase aquosa: Tween 80®191,5 mg
 - Água destilada.....130 mL

A metodologia de obtenção foi a mesma utilizada para o estudo piloto de obtenção da NC contendo óleo *C. multijuga* Hayne (item 4.3.1).

4.4 Avaliação da influência do tipo de polímero e concentração de óleo na obtenção das NC de óleo de *C. reticulata* Ducke

Foi utilizado um planejamento fatorial do tipo 2^2 , replicado, onde foram avaliados tipos de polímeros e diferentes concentrações do óleo, de acordo com a tabela 2:

Fatores	Níveis
A) Tipo de polímero	(-) Poli- ϵ -caprolactona
	(+) Poli-ácido láctico co-glicólico
B) Concentração do óleo	(-) 2,5 % (1 mL)
	(+) 5,0 % (2 mL)

Tabela 2 - Desenho fatorial do tipo 2^2

As concentrações dos demais componentes da formulação foram mantidas constantes, apenas mudaram-se as concentrações de óleo. Como variáveis de respostas

foram avaliada o potencial zeta, o diâmetro médio de partícula e o pH. A matriz do planejamento fatorial está descrito na tabela 3:

FORMULAÇÃO	FATORES	
	A	B
NC.1	-	-
NC.2	+	-
NC.3	-	+
NC.4	+	+
NC.5	-	-
NC.6	+	-
NC.7	-	+
NC.8	+	+

Tabela 3 - Matriz do planejamento fatorial 2^2 aplicado ao preparo de NC de óleo de *C. reticulata*

4.5 Avaliação das suspensões de NC contendo óleo de *C. reticulata* Ducke

As suspensões contendo as nanocápsulas foram analisadas com relação ao teste de centrifugação, distribuição do diâmetro médio das partículas, índice de polidispersão, potencial zeta, pH, taxa de encapsulação, análise em microscópico de força atômica e avaliação do comportamento reológico em viscosímetro rotacional. A exceção da taxa de encapsulação, morfologia em microscópico de força atômica e o comportamento reológico os demais itens foram analisados durante 4 meses, a fim de avaliar sua estabilidade.

4.5.1 Teste de centrifugação (PUISIEUX & SEILLER, 1983)

A avaliação da estabilidade das formulações frente à centrifugação foi realizada empregando-se 5 g das amostras em estudo, centrifugando-se a 3000 rpm, durante 30 minutos. Após a centrifugação as amostras foram avaliadas macroscopicamente através da verificação da cor, presença de precipitados e ou separação de fases.

4.5.2 Distribuição do tamanho médio das partículas e índice de polidispersão

As determinações do diâmetro médio e do índice de polidispersão das nanocápsulas foram realizadas através de espalhamento de luz dinâmico. As análises foram realizadas diluindo-se 1:10 (v/v) as suspensões de nanocápsulas em água destilada para análise no equipamento Zetasizer[®] à 25 °C. Os resultados foram determinados através da média de três repetições.

4.5.3 Potencial Zeta

O potencial zeta das suspensões de nanocápsulas foi obtido em equipamento Zetasizer[®]. As análises foram realizadas diluindo-se 1:10 (v/v) as suspensões de nanocápsulas em água destilada para análise no equipamento. Os parâmetros utilizados estão descritos na tabela 4, sendo a medição ajustada pela equação de Smoluchowski:

Parâmetros	Água destilada (Dispersante)	Nanocápsulas
Temperatura (°C)	25	25
Viscosidade	0,8872	-
Índice de refração	1,330	1,590
Constante dielétrica	78,5	-

Tabela 4 – Parâmetros utilizados para análise das nanocápsulas no equipamento Zetasizer[®]

Os resultados foram determinados através da média de três repetições.

4.5.4 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada em potenciômetro previamente calibrado com solução tampão pH 4,0 e 7,0, sendo as medidas feitas diretamente nas suspensões. Os resultados foram expressos pela média das três determinações.

4.5.5 Avaliação do comportamento reológico

Foi realizada com auxílio de viscosímetro rotacional Brookfield, utilizando spindle SC4-18. As análises reológicas foram obtidas com variação da velocidade de 0 a 200 RPM (curva ascendente) e de 200 a 0 RPM (curva descendente), com um tempo de 30 segundos e leitura de 30 pontos. O equipamento forneceu os dados de tensão de cisalhamento e taxa de deformação através do *software* Brookfield Rheocalc versão 3.2.

A construção dos reogramas foi feita através da representação gráfica da taxa de cisalhamento em função da tensão de cisalhamento.

4.5.6 Microscopia de força atômica (AFM)

A análise morfológica das NCs foi feita por um microscópio de força atômica Shimadzu. O suporte para deposição da amostra foi a mica, visando minimizar a interferência da rugosidade do substrato na análise da amostra. O material analisado foi resultado de uma gota da NC (diluída 1:10 (v/v) em água destilada) na folha de mica, e este material foi colocado posteriormente em placa de Petri até a evaporação total a temperatura ambiente por três dias.

4.5.7 Taxa de encapsulação (modificado de DIAS *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2012)

A taxa de encapsulação foi realizada no Laboratório de Física Industrial da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto (USP- FCFRP).

A eficiência de encapsulação do OC nas nanocápsulas foi determinada pelo método de ultrafiltração/centrifugação, que consistiu em submeter às nanocápsulas à centrifugação em dispositivos de ultrafiltração constituídos de celulose regenerada de 10 kDa (Millipore[®]) e quantificação do ultrafiltrado em HPLC. Neste caso, passa-se pela membrana de 10 kDa o óleo livre (ou substâncias presentes no óleo que não esteja

encapsulada), sendo assim, por diferença do 100% de óleo e concentração de óleo não associado foi determinada a eficiência de associação de óleo às nanocápsulas.

4.5.7.1 Preparo das amostras de NCs

O conteúdo de ácido caurenóico presente nas NCs foi extraído através da diluição de 200 μL de nanocápsulas em 1 mL de acetonitrila, seguida de homogeneização por ultrasom (20 min). O teor de ácido caurenóico presente na fase aquosa foi separado das NCs após ultrafiltração-centrifugação (10.000 RPM por 20 min.). Onde 400 μL das NCs foram colocadas no dispositivo de ultra-centrifugação e após a centrifugação, retirou-se 300 μL do filtrado e completou-se o volume com acetonitrila em balão volumétrico de 1 mL. Todas as amostras foram filtradas em filtro Millipore de 0,45 μm antes da injeção em HPLC.

4.5.7.2 Condições cromatográficas

As análises foram realizadas utilizando HPLC (Thermo Scientific) acoplado à coluna C18 Phenomenex. A aquisição e o processamento de dados foram realizados pelo *Software* Thermo Scientific Dionex Chromeleon[®] 7.

Como sistema de eluição foi empregado gradiente linear conforme tabela 5, constituído de fase móvel:

- A) Solução aquosa de Ácido ortofósforico 1 milimolar com pH de 3,32.
- B) Acetonitrila.

As análises foram realizadas empregando fluxo de 1 mL/min e injeção de 20 μL e detecção a 254 nm.

Tempo (min.)	A (%)	B (%)
0 – 25 min	15	100
25- 30 min	0	100
30 a 40 min	15	100

Tabela 5 - Gradiente de eluição do sistema cromatográfico

Os picos dos cromatogramas foram identificados através da comparação com o tempo de retenção e área do padrão ácido caurenóico (AC) no comprimento de onda de 254 nm.

4.5.7.3 Curva de calibração do ácido caurenóico (AC)

A curva analítica do AC foi preparada pesando-se 2 mg de AC e dissolvendo em acetonitrila em balão volumétrico de 1 mL (solução-mãe). A partir desta solução foram realizadas diluições para obter concentrações de 50; 150; 230; 350 e 500 µg/mL. As soluções foram filtradas através de filtro Millipore de 0,45 µm antes da injeção em HPLC. As determinações foram realizadas em triplicata.

4.5.7.4 Limite de detecção

O limite de detecção para o AC calculado através da fórmula:

$$LD: \frac{DPa \times 3}{IC}$$

em que: DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações próximas ao suposto limite de quantificação. IC é a inclinação da curva de calibração.

4.5.7.5 Limite de quantificação

O limite de detecção para o AC foi calculado através da fórmula:

$$LQ: \frac{DPa \times 10}{IC}$$

em que: DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações próximas ao suposto limite de quantificação. IC é a inclinação da curva de calibração

4.5.7.6 Repetibilidade

O estudo da repetibilidade foi realizado através da análise de seis diluições de óleo de *C. reticulata* Ducke, para tanto pesou-se 52 mg do óleo e diluiu-se em um balão volumétrico de 10 mL com acetonitrila.

Este estudo, também foi realizado com três concentrações diferentes. Foram pesados, aproximadamente, 35 mg, 57 mg e 79 mg de óleo bruto, diluindo-se em um balão volumétrico de 10 mL de acetonitrila. Sendo a análise realizada em triplicata.

Os resultados foram expressos através do coeficiente de variação (CV).

4.6 Análise estatística (MONTGOMERY, 1991)

Os resultados dos experimentos foram expressos através de média aritmética e desvio padrão. A análise do planejamento fatorial foi realizada estatisticamente através de ANOVA *two-way*. As análises de caracterização do óleo foram realizadas através de ANOVA seguida de Teste de Tukey. A análise estatística foi realizada com auxílio do programa estatístico Minitab versão 14.1.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização físico-química dos OC

Conhecer as características físico-químicas dos óleos, de uma forma geral, é importante para avaliar e confirmar a qualidade dos mesmos, e com isso permitir às comunidades e arranjos produtivos locais a comercializar melhor seu produto.

A carência de estudos químicos visando à caracterização do óleo de copaíba, aliada à variabilidade natural inerente a esta matéria-prima e à crescente demanda do mercado por medicamentos fitoterápicos, pode comprometer a autenticidade e a efetividade dos produtos contendo óleo de copaíba (BIAVATTI *et al.*, 2006).

Assim, foi realizada a caracterização físico-química dos diferentes OC obtidos através da determinação dos ensaios de densidade, índice de refração e viscosidade, sendo os resultados mostrados na tabela 6:

Óleos	Densidade (g/cm ³) $\bar{x} \pm s$	Índice de Refração $\bar{x} \pm s$	Viscosidade $\bar{x} \pm s$
OCM 1	0,915 ± 0,000 ^{ef}	1,441 ± 0,000 ^{fg}	16,175 ± 0,395 ^{ef}
OCM 2	0,911 ± 0,001 ^g	1,443 ± 0,001 ^{def}	11,766 ± 0,352 ^g
OCM 3	0,923 ± 0,000 ^{cd}	1,443 ± 0,000 ^{def}	18,352 ± 0,516 ^d
OCM 4	0,925 ± 0,001 ^c	1,448 ± 0,000 ^b	23,569 ± 1,240 ^b
OCM 5	0,917 ± 0,001 ^e	1,445 ± 0,001 ^c	16,213 ± 0,676 ^e
OCM 7	0,931 ± 0,002 ^b	1,443 ± 0,001 ^{def}	22,743 ± 0,390 ^{bc}
OCR	0,957 ± 0,000 ^a	1,513 ± 0,001 ^a	79,508 ± 1,000 ^a

Tabela 6 - Caracterização físico-química dos óleos de Copaíba. Onde: OCM 1a7: óleo de *Copaifera multijuga* Hayne de diferentes procedências e OCR: óleo de *Copaifera reticulata* Ducke. Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não se diferenciam estatisticamente segundo o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$)

A densidade dos óleos de *C. multijuga* Hayne variou de 0,911 a 0,931 g/cm³ e conforme o teste de Tukey não há diferença estatística entre os óleos OCM 1 e OCM 5, OCM 3 e OCM 4. Medeiros (2006) encontrou a densidade de 0,89 g/mL para OCM coletados na Reserva Florestal Adolpho Ducke (Manaus-AM). DEUS *et al.* (2009) (2011) encontraram a densidade de 0,8466 mg/mL para OCM coletados no município de Santarém. Silva *et al.* (2012_b) avaliaram a densidade do óleo de *C. langsdorffii* Desf. e obtiveram como resultado 0,9175 mg/mL, resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho.

Com relação à densidade do óleo de *C. reticulata* Ducke foi determinado o valor de 0,957 g/cm³, valor superior ao encontrado para os OCM, com diferença estatística significativa entre os mesmos. Estudo realizado por Silva et al. (2012_a) na mesma área do presente estudo acharam como densidade média do óleo *C. reticulata* o valor de 0,98 g/cm³, valor superior ao encontrado no presente trabalho. Já Freire et al. (2011) utilizando óleo de *C. paupera* encontraram densidade de 0,9534 g/mL, resultado muito próximo ao encontrado para a espécie *C. reticulata* do presente estudo.

Os resultados achados para os índices de refração (IR) dos OCM foram de 1,441 a 1,448 e 1,513 para o OCR. Não houve diferença estatística entre OCM 1, OCM 2, OCM 3 e OCM 7, conforme teste de Tukey.

Barbosa et al. (2009) determinaram índices de refração (IR) a 20°C de oito amostras de óleo de *C. multijuga* Hayne coletadas na Reserva de Desenvolvimento Sustentável de Tupé (Manaus-AM), cujos resultados variaram de 1,50284 a 1,50786 e, em doze amostras de óleo de copaíba adquiridas no mercado local com IR na faixa de 1,48176 a 1,50886. Neste mesmo trabalho, os autores mostraram que IR aliado a cromatografia de camada delgada (CCD) auxilia na detecção de óleos vegetais em óleo-resina de copaíba, contribuindo para o controle de qualidade desses óleos.

Brito et al. (2000) analisaram óleo de *C. reticulata* Ducke com IR de 1,515, resultado semelhante ao encontrado no OCR estudado neste trabalho. Freire et al. (2011) utilizando óleo de *C. paupera* encontraram IR a 21°C de 1,512. Silva et al. (2012_a) encontraram o mesmo valor de IR (1,51) utilizando a mesma espécie (*C. reticulata*) e óleo proveniente da mesma área. Dessa forma, considerando o parâmetro índice de refração (IR) e, em particular para o OCR estudado, os dados encontrados neste trabalho sugerem que não houve alteração desde a data de coleta até o presente momento.

A alta variabilidade observada indica que cada árvore deve ser analisada separadamente, e que grupos de árvores com características similares, também devem ser manejados separadamente. Esse manejo pode agregar valor ao produto, pois a mistura de óleo-resina pode diminuir sua qualidade (Silva et al., 2012_a).

A variação observada nos óleos-resinas de copaíba propicia e favorece diferentes utilizações industriais. Entre as características físico-químicas, a baixa viscosidade e acidez são importantes para o processamento farmacêutico (VEIGA JUNIOR & PINTO, 2002).

A viscosidade é uma medida da resistência interna de uma substância a fluir quando submetida à tensão, uma vez que quanto maior a viscosidade maior a resistência do líquido para escoar. Da mesma forma, a taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) corresponde à variação da velocidade (dv) entre duas superfícies do líquido como uma função da camada molecular (dr), indicando a taxa que o líquido flui quando é aplicada uma força especificada (ALVES *et al.*, 2011).

A reologia pode então, ser definida como o estudo das propriedades de fluxo e deformação da matéria. As propriedades reológicas exercem um importante papel no preparo e na utilização de formas farmacêuticas e cosméticas (AULTON, 2005).

A relação entre a viscosidade e a velocidade de cisalhamento revela a natureza do comportamento reológico, que pode ser newtoniano ou não-newtoniano. No caso do fluxo newtoniano, a tensão de cisalhamento (τ) é diretamente proporcional à velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$), ou $\tau = \eta\dot{\gamma}$, onde η é a viscosidade. Consequentemente, o valor da viscosidade de tais substâncias apresentará sempre o mesmo valor, independente da velocidade de cisalhamento ou da tensão de cisalhamento (ALVES *et al.*, 2011). Normalmente, os materiais que apresentam comportamento newtoniano são quimicamente puros ou são soluções de solutos de massa molar reduzida. A água, a glicerina, tinturas e óleos vegetais utilizados em formulações farmacêuticas e cosméticas são alguns exemplos de fluídos newtonianos (ALVES, 2006).

Por outro lado, um fluido não-newtoniano não apresenta uma relação linear direta entre a tensão de cisalhamento e taxa de cisalhamento, e as interações entre as partículas são os principais responsáveis pelo desempenho reológico complexo destes sistemas. A curva de fluxo representativo, ou reograma, é obtida pela representação gráfica entre a relação tensão de cisalhamento versus taxa de cisalhamento (ALVES *et al.*, 2011).

A viscosidade encontrada para os OCM variou de 11,766 a 23,569 Pa (Tabela 6). Conforme o teste Tukey, não houve diferença estatística entre os óleos OCM1 e OCM5, OCM4 e OCM7. A viscosidade encontrada para OCR foi de 79,508 Pa, valor de viscosidade superior ao encontrado para os OCM. A viscosidade relatada por Silva et al. (2012_a) foi de 82,27 Pa para o OCR, indicando assim, que a viscosidade do óleo-resina proveniente de *C. reticulata* parece ser maior que óleos provenientes de *C. multijuga*.

Os reogramas dos OCM e OCR são mostrados nas figuras 5 e 6, respectivamente. Através desses gráficos foi caracterizado o comportamento reológico dos óleos estudados, onde o comportamento verificado foi do tipo fluido-Newtoniano, uma vez que a tensão de cisalhamento é diretamente proporcional à taxa de cisalhamento.

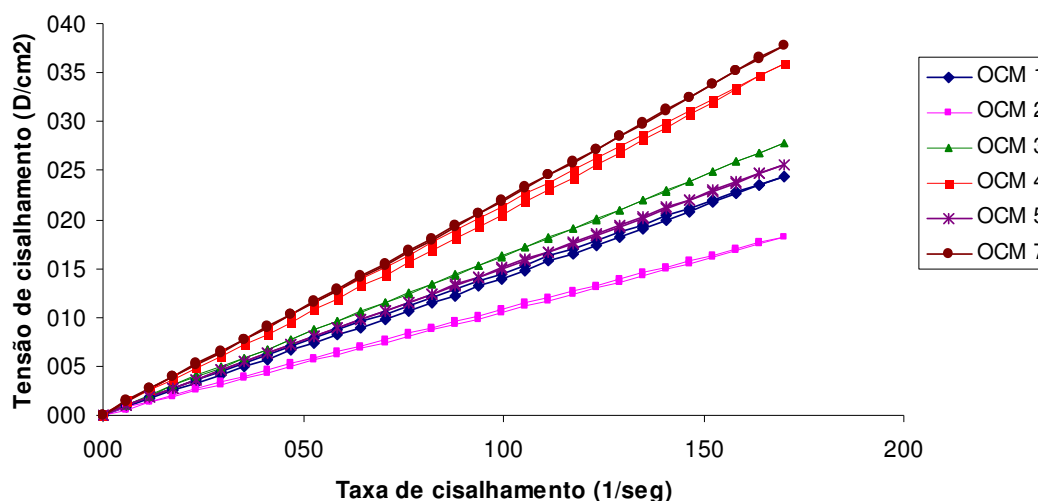


Figura 5 - Comportamento reológico para os óleos de *Copaifera multijuga* Hayne (OCM) a 25 °C

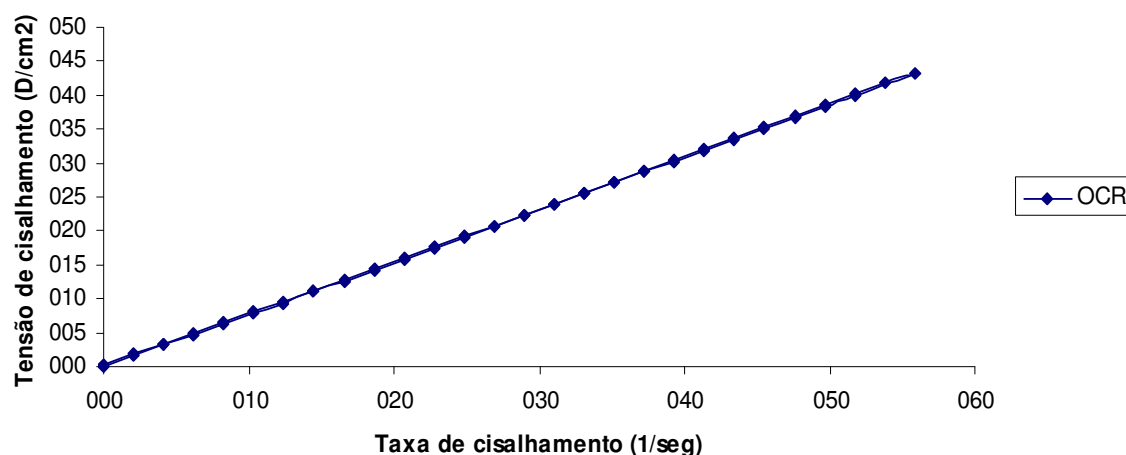


Figura 6 - Comportamento reológico para o óleo de *Copaifera reticulata* Ducke (OCR) a 25 °C

Nas Figuras 7 e 8 é apresentado o diagrama da viscosidade em função da taxa de cisalhamento para os óleos de OCM e OCR estudados. Para valores de taxa de cisalhamento superiores a 10 s^{-1} o comportamento verificado é do tipo fluido-Newtoniano, uma vez que a viscosidade é constante para qualquer valor de taxa de cisalhamento.

Tal comportamento Newtoniano está de acordo com os resultados apresentados na literatura para alguns óleos vegetais (MASKAN, 2003; SANTOS *et al.*, 2004; BROCK *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2010). Estudo realizado por Pontes *et al.* (2003) utilizando óleo de copaíba bruto e óleo de copaíba comercial encontrou comportamento Newtoniano para as amostras avaliadas, resultado compatível com os óleos estudados no presente trabalho.

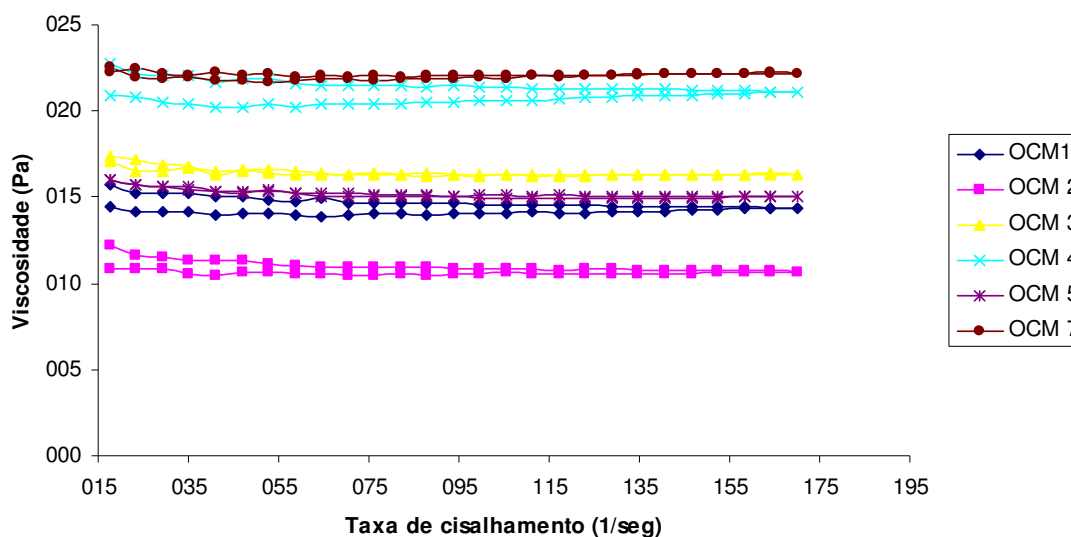


Figura 7 - Diagrama de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para os óleos de *Copaifera multijuga* Hayne (OCM) a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$

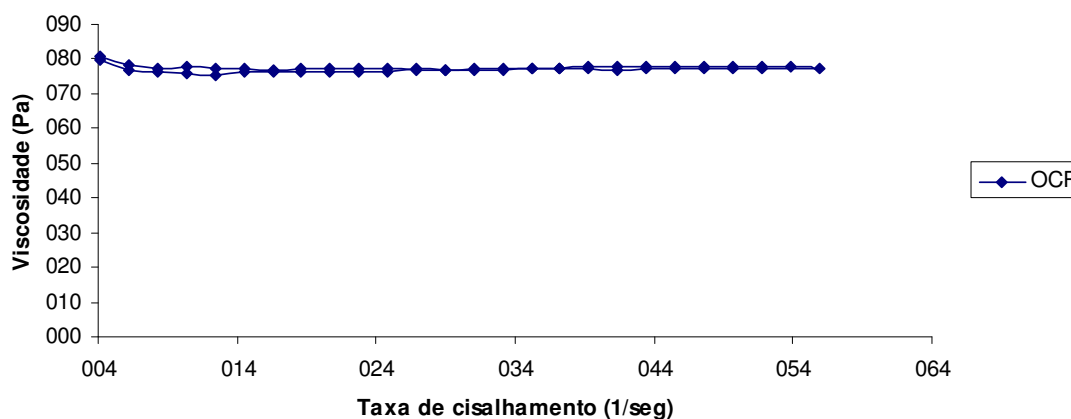


Figura 8 - Diagrama de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para o óleo de *Copaifera reticulata* Ducke (OCR) a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$

5.1.1 Análises Cromatográficas

Apesar de suas propriedades terapêuticas, um dos maiores obstáculos para a comercialização mais ampla e aplicação do óleo-resina de Copaíba nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos é a variabilidade química dentro e entre as espécies que esses óleos apresentam, sugerindo a necessidade de estabelecer normas para o controle de qualidade dos mesmos. A variação na composição química desse óleo já é conhecida e amplamente descrita na literatura, apesar de que os fatores que causam esta variabilidade ainda não são completamente conhecidos e identificados (BARBOSA, *et al.*, 2012).

Técnicas modernas e já bem estabelecidas, de isolamento e identificação de substâncias, levaram a um melhor conhecimento da composição química do óleo-resina de copaíba, com mais de 100 sesquiterpenos e 40 diterpenos tendo sido identificados para várias espécies do gênero *Copaifera* (BARBOSA *et al.*, 2012; LEANDRO *et al.*, 2012).

A Cromatografia Gasosa (CG) é a técnica mais eficiente para a separação cromatográfica de misturas voláteis, devido ao seu elevado poder de resolução utilizando o detector de ionização de chama (MERFORT, 2002). Alguns trabalhos analíticos têm sido realizados buscando a padronização do óleo-resina de copaíba, apesar de suas variações naturais, através de diferentes técnicas cromatográficas, sendo que entre elas a cromatografia gasosa é a técnica mais empregada (BIAVATTI *et al.*, 2006, BARBOSA, *et al.*, 2013).

Para comparar os perfis cromatográficos entre os diferentes óleos estudados no presente trabalho, foi utilizada a Cromatografia de fase gasosa com Detector de Ionização de Chama (CG/DIC). Para tanto, os perfis cromatográficos das amostras foram comparados entre si e com o perfil do padrão óxido de cariofileno (padrão disponível no laboratório).

Nas figuras 9 e 10 são mostrados os perfis cromatográficos dos OCMs e OCR por CG/DIC, na figura 11 é mostrado o perfil do padrão óxido de cariofileno e na tabela

7 são mostrados os principais tempos de retenção e as áreas das substâncias presentes nos óleos.

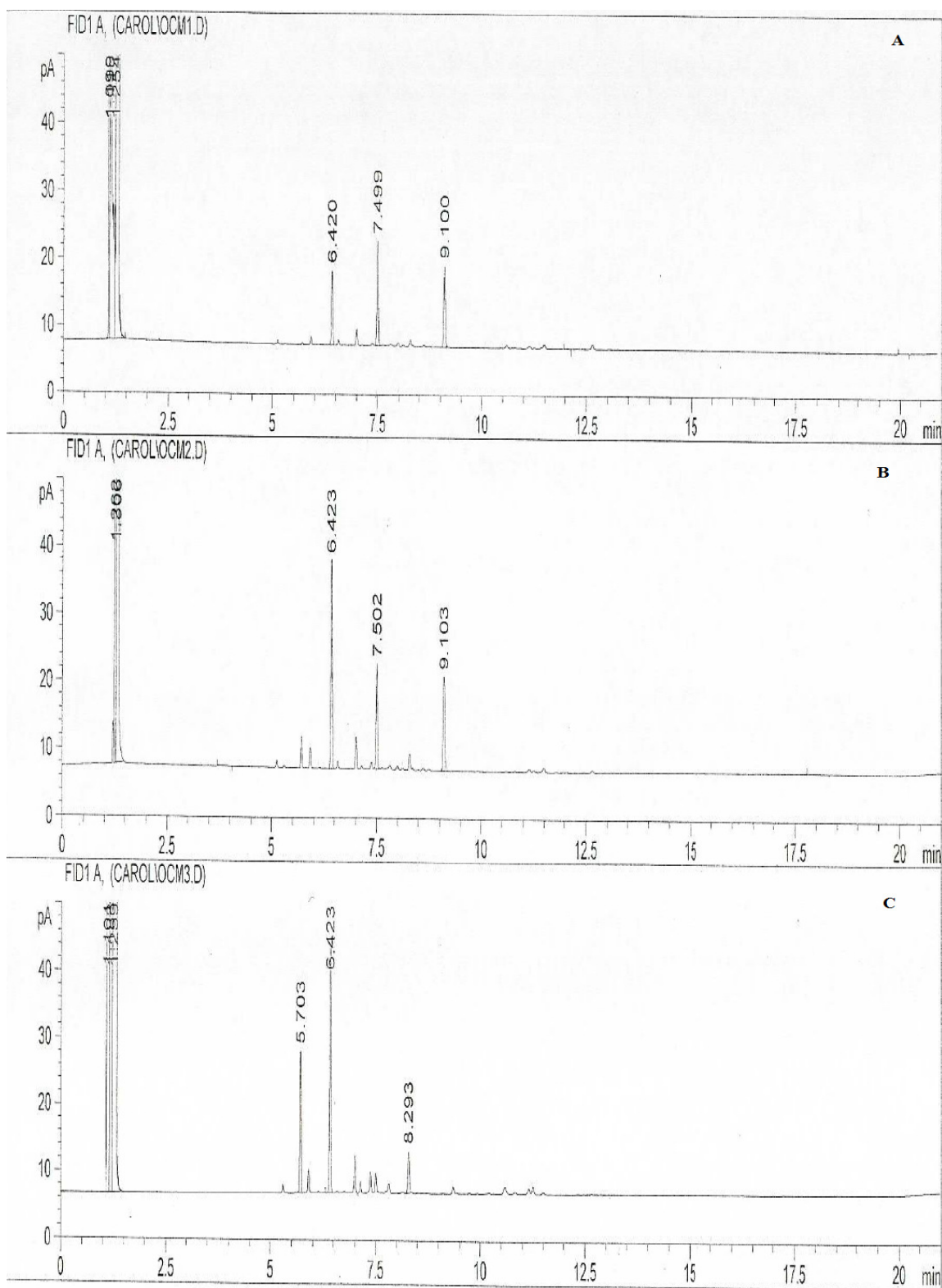


Figura 9 - Perfil cromatográfico dos óleos *C. multijuga* Hayne (OCM) por CG-DIC. Onde A: OCM1, B: OCM2 e C: OCM3

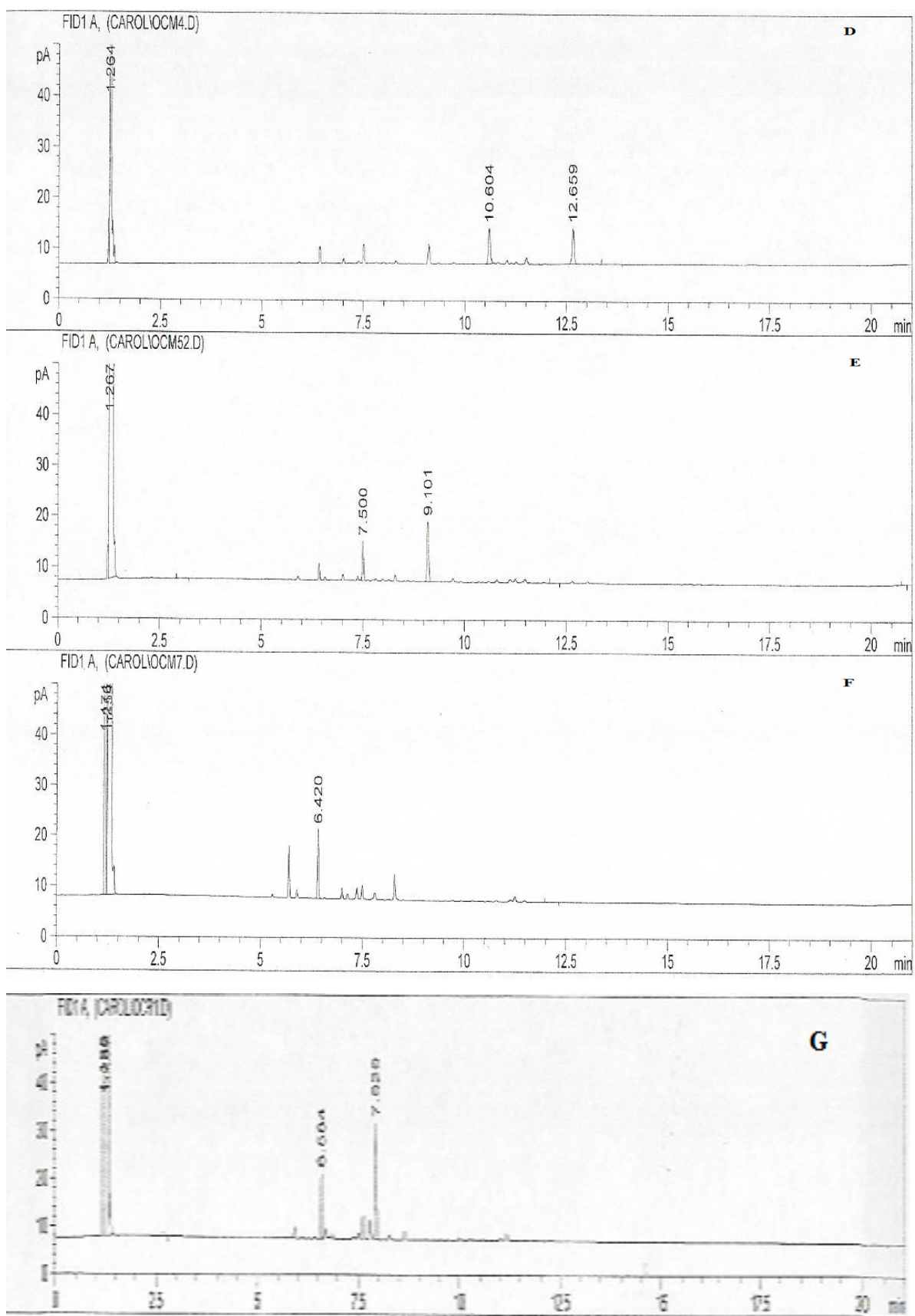


Figura 10 - Perfil cromatográfico dos óleos *C. multijuga* Hayne (OCM) e *C. reticulata* Ducke (OCR) por CG-DIC. Onde D: OCM4, E: OCM5, F: OCM7 e G: OCR

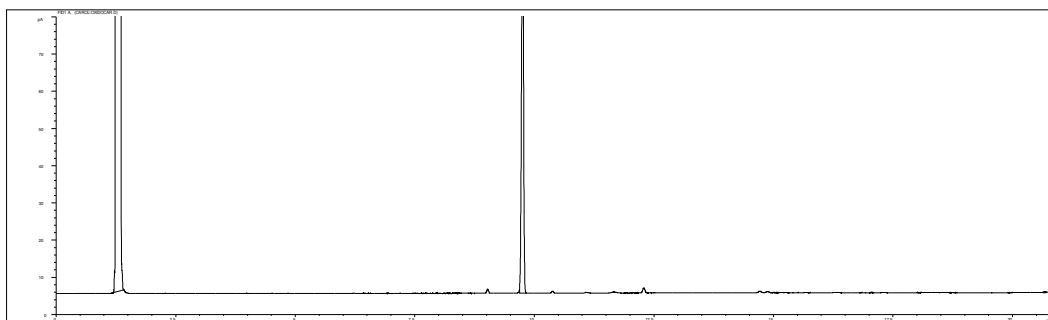


Figura 11 - Perfil cromatográfico do padrão óxido de cariofileno

Óleos	TR (min)	Área (PA*s)
OCR	6.584	27.10
	7.929	57.70
OCM1	6.420	22.96
	7.499	36.55
	9.100	33.52
OCM2	6.423	64.69
	7.502	36.01
	9.103	37.76
OCM3	5.703	38.21
	6.423	74.71
	8.293	15.50
OCM4	10.604	24.71
	12.659	24.44
OCM5	7.500	17.87
	9.101	32.26
OCM7	6.420	28.15

Tabela 7 - Principais tempos de retenção e as áreas das substâncias presentes nos óleos de *C. reticulata* Ducke (OCR) e *C. multijuga* Hayne (OCM) por CG-DIC.

Pode-se observar através dos cromatogramas que os OCM, em geral, apresentam perfil cromatográfico semelhante. Comparando-se os OCM entre si, percebe-se que todos os óleos apresentaram picos nos tempos de retenção em torno de 6.420 e 7.500 minutos. Destacam-se com perfil mais semelhante os óleos OCM 1 e OCM 2 que apresentaram os 3 picos principais praticamente no mesmo tempo de retenção, diferenciando apenas a área dos picos. O OCM 4 apresentou picos majoritários diferentes dos demais óleos (10.604 e 12.659 min).

Comparando-se os óleos com o padrão óxido de cariofileno (Figura 11), notou-se que nenhum dos picos encontrados para os óleos correspondem ao pico máximo de óxido de cariofileno (9.755 minutos). Fato que sugere que pode não haver óxido de cariofileno nas amostras dos óleos e devendo ser confirmado pelo CG/EM.

Posteriormente a CG/DIC, os óleos foram submetidos à análise de identificação por cromatografia de fase gasosa acoplada a espectrometria de massas CG/EM. A CG/EM é utilizada especialmente para auxiliar a confirmação e ou identificação de componentes que também sejam voláteis e ou termicamente estáveis. Esta técnica permite como a CG-DIC, a separação dos constituintes e ainda fornece um espectro de massas para cada pico. Por meio da análise destes espectros sugere-se o peso molecular dos compostos de interesse. Além disso, há a possibilidade de comparar os dados obtidos da espectrometria de massas em relação àqueles disponíveis nas bibliotecas eletrônicas de compostos, bem como àqueles citados na literatura (SOUSA, 2011_a).

Visando demonstrar o efeito comparativo da composição química entre os óleos, na tabela 8 são apresentadas os compostos presentes nos diferentes OCMs e OCR. Nessa tabela, observa-se a variabilidade dos compostos presentes nos óleos, índice de retenção e a porcentagem relativa desses compostos.

Constituintes	IR	OCR	OCM1	OCM2	OCM3	OCM4	OCM5	OCM7
Copaeno	1221		0.25	7.08	29.13	3.73	3.75	32.17
δ -elemeno	1335		2.89	1.77		1.66	2.65	
α -cubebeno	1344		2.25	0.42	1.74			2.06
α -copaeno	1375		0.30			0.26		
β -elemeno	1390	2.79	4.54	3.97		2.93	4.75	
Trans-cariofileno		0.48						
β -cedreno	1423	1.41						
Trans- α -bergamoteno	1430	18.72						
Metanoazuleno	1432		0.51					
Aromadendreno				0.44				2.01
Nafitaleno	1435	4.00		1.01	3.31	1.85	1.11	0.51
α -guaiano		2.55						
1,6,10-Dodecatrieno	1440	1.26						0.22
α -muuroleno	1440							0.22
α -humuleno	1454	3.14	4.85	6.00	8.02	5.30	4.55	4.84
Biciclododec-1-eno	1464				4.50			4.36
γ -elemeno	1465		2.87	3.17		1.60	3.46	
Germacreno-D	1484		29.20	19.59	2.46	16.85	28.48	5.47
β -cariofileno	1494		37.40	38.87	40.68	35.29	30.49	31.92
Biciclogermacreno	1497						0.34	1.16
γ -cadineno	1512						1.51	4.12
Cis- α -bisaboleno	1518	2.86						
δ -cadineno	1522			2.81	7.29	1.36	2.15	9.79
Germacrene-B	1557		14.94	14.88		8.04	16.77	
1-Nafitalenol	1580					9.16		0.40
Epi- γ -eudesmol	1624				0.88			
α -epi-muurolol	1641				0.69	1.22		0.97
Cedren-13-ol	1646	0.29						
Hexadecametil-ciclooctasioxano	1654	1.72						
Humulano-1,6-dien-3-ol	1757				0.77	9.60		
Caur-16-eno	1789	1.24						
Octadecametil-ciclononasiloxano	1860	2.97						
Icosametildodecasiloxano	2067	2.28						
Trans-benzeno-metil fenil sulfóxido	2835	0.39						
(E)- β -farneseno		2.15						
β -selineno		7.83				1.15		
β -bisaboleno		43.08						
Ciclododecasiloxano		0.36						
α -Cadinol					0.53			

Tabela 8 - Composição percentual dos *C. multijuga* Hayne (OCM) e *C. reticulata* Ducke (OCR). Onde: IR = Índice de Retenção

Ao analisar a tabela 8, pode-se visualizar que para o OCR estudado foi possível identificar 19 constituintes, sendo a substância majoritária o β -bisaboleno (43.08%), seguida de Trans- α -bergamoteno (18.72%) e β -Selineno (7.83%).

Para os OCMs o sesquiterpeno majoritário encontrado foi o β -cariofileno, seguido dos compostos Copaeno, α -humuleno e Germacreno-D, variando apenas sua quantidade percentual entre os óleos. Para o OCM 1 foram identificados 11 constituintes sendo os principais: β -cariofileno (37.40%), Germacreno-D (29.20%), Germacreno-B (14.94%) e α -humuleno (4.85%). Foram identificados 12 constituintes

no OCM 2, sendo β -cariofileno (38.87%), Germacreno-D (19.59%), Germacreno-B (14.88%) e Copaeno (7.08%). No OCM 3 foram encontrados 12 constituintes, tendo como principais: β -cariofileno (49.68%), Copaeno (29.13%), α -humuleno (8,02%) e δ -cadineno (7.29%). Para OCM 4 encontrou-se 15 constituintes sendo β -cariofileno (35.29%), Germacreno-D (16.85%), Germacreno-B (8.04%) e α -humuleno (5.30%). Para OCM 5 encontrou-se 12 constituintes sendo β -cariofileno (30.49%), Germacreno-D (28.48%), Germacreno-B (16.77%) e β -elemeno (4.75%). Para o OCM 7 identificou-se 15 constituintes sendo β -cariofileno (31.92%), Copaeno (32.17%), δ -cadineno (9.79%) e α -humuleno (4,84%).

Assim, observa-se que em geral os óleos mais semelhantes com relação aos sesquiterpenos principais foram entre si o OCM 1, OCM 2, OCM 4 e OCM 5 e entre si o OCM 3 e OCM 7. Sendo que os óleos OCM 1, OCM 2, OCM 3, OCM 4 e OCM 7 foram coletados em estação seca, OCM 5 coletado em estação chuvosa e OCM 7 proveniente de solo argiloso.

Ao se comparar os OCM com o OCR (Tabela 8), percebe-se que o composto α -humuleno foi o único composto encontrado em todos os óleos, variando apenas sua quantidade percentual e sendo esses valores relativamente próximos entre si. Os resultados mostraram algumas diferenças na composição quantitativas e qualitativas entre os componentes do óleo-resina de *C. reticulata* e *C. multijuga*. Esta alta variabilidade intra-específica na composição de sesquiterpenos é observada quando se comparam diferentes estudos, geralmente limitados a um único indivíduo, e para uma espécie determinada, como mostrado posteriormente nesse trabalho.

Vale ressaltar que todos os sesquiterpenos identificados nesse trabalho já foram identificados e detectados no gênero *Copaifera*. Os sesquiterpenos foram os componentes mais comuns e foram encontrados quase os mesmos em vários diferentes óleos de copaíba mudando, principalmente, a composição quantitativa que a composição qualitativa (LIMA *et al.*, 2003; GOMES *et al.*, 2007).

Cascon e Gilbert (2000) encontram para *C. multijuga* os sesquiterpenos β -cariofileno, α -copaeno e trans- α -Bergamotene. Lima et al. (2003) analisaram a composição química do óleo de *C. multijuga* Hayne obtido da Reserva Ducke (AM) e

encontraram β -cariofileno como composto principal. Gomes et al. (2007) avaliaram a composição química das espécies *C. multijuga* e *C. reticulata*, obtidos respectivamente da Reserva Ducke (AM) e do estado do Acre, encontrando trans- β -cariofileno componente majoritário para ambos óleos.

Veiga Junior et al. (2007_b) estudaram óleos de *Copaifera multijuga* Hayne, *Copaifera cearensis* e *C. reticulata* Ducke e encontraram como sesquiterpeno principal o β -cariofileno (57.5, 19.7 e 40.9%, respectivamente), seguido de α -humuleno, α -copaeno, α -bergamoteno e δ -cadineno. Como diterpenos, para o *C. reticulata* encontraram ácido caurenóico (3.9%) e ácido covalênico (3.4%).

Pesquisa realizada por Santos et al. (2008_a) avaliaram 9 óleos de Copaíba obtidos de diferentes espécies do gênero. Neste estudo, diferente do encontrado nessa dissertação, eles identificaram para as espécies *C. reticulata* do estado do Pará e *C. reticulata* do estado do Acre, como sesquiterpenos majoritários o β -cariofileno (40.9%) e α -copaeno (25.1%), e como diterpenos o ácido caurenóico (3.9%) e o ácido copálico (7.7%), respectivamente. Para as espécies *Copaifera cearensis*, *Copaifera langsdorfii*, *Copaifera officinalis*, *Copaifera multijuga* e *Copaifera lucens* verificaram como composto majoritário o β -cariofileno em diferentes proporções quantitativas. *Copaifera martii* e *Copaifera paupera* tiveram como composto majoritário o β -bisaboleno.

Os resultados da análise cromatográfica do óleo-resina da *Copaifera multijuga* Hayne revelaram que entre os seus componentes estão vários sesquiterpenos, principalmente cubenol (16,7%), óxido de cariofileno (11,5%), β -cariofileno (9,2%), bisabolol (7,2%), α -humuleno (1,8%), Germacreno D (3,5%), e também diterpenos de esqueleto labdano, como os ácidos copálico (2,1%), 3 β -hidróxi-copálico (1,7%) e pinifólico (1,3%) (VASCONCELOS *et al.*, 2008).

Estudo realizado por Deus et al. (2009) avaliaram a composição do OCM coletado no município de Santarém, como constituintes principais β -cariofileno (67,07%), α -humuleno (10,87%), Trans- α -bergamoteno (6,08%), sendo que neste óleo foi encontrado também β -bisaboleno (1,43%).

Zoghbi et al. (2009) estudaram a composição química de óleos de *C. reticulata* Ducke oriundos do estado do Pará e Amapá por CG/DIC e CG/EM. Os óleos-resinas obtidos do Pará tinham como componentes principais o β -bisaboleno (18,4 a 42,4%) e trans- α -bergamoteno (11,8 a 29,6%), resultados semelhantes aos encontrados para o presente estudo. Já para os óleos obtidos do estado do Amapá, o constituinte principal foi β -cariofileno (27.8 a 68.0%), o que mostrou que há uma elevada variação entre os compostos presentes nos óleos de *C. reticulata*.

Herrero-Jáuregui et al. (2011) analisaram 31 amostras de OCR e destacaram o elevada grau de variabilidade intra-espécie encontrada na composição e concentração de sesquiterpenos. Os principais componentes de OCR foram β -bisaboleno, trans- α -bergamoteno e β -cariofileno, diferente do encontrado no OCR analisado e estudado neste trabalho.

A fração volátil de OCM coletada no estado do Pará, segundo trabalho de Sachetti et al. (2011), apresentou como constituintes principais o β -cariofileno (25.1 a 50.2%), β -bisaboleno (5.2 a 17.4%) e trans- α -bergamoteno (6.4 a 12%).

Barbosa et al. (2012) estudaram 16 óleos de *C. multijuga* Hayne coletados da Reserva Ducke (AM). Os compostos α -copaeno, α -muuroleno, α -amorpheno, β -cariofileno, óxido de cariofileno, ácido copalico e ácido pinifolico foram detectados em todas as amostras analisadas. Sendo que, o α -humuleno foi encontrado em 15 amostras.

Dias et al. (2012) encontraram como constituinte principal do óleo de *C. multijuga* coletado da Reserva Adolfo Ducke (AM) o β -cariofileno (29.82%) seguido de Germacreno D (15.86%). Resultados semelhantes ao encontrado nessa dissertação. Trindade et al. (2013) encontraram como constituintes principais do óleo de *C. multijuga* coletado no estado de Rondônia o β -cariofileno (57,1%), α -humuleno (10,2%) e β -sesquifelandreno (9.9%).

Ziech et al. (2013) determinaram a composição química do OCR, proveniente do estado do Pará sendo que β -cariofileno, β -bisaboleno e (*E*)- α -bergamoteno foram os compostos majoritários.

Estudo realizado por Basile et al. (1998), em óleo-resina oriundo de *Copaifera sp*, destacou como principais constituintes o β -bisaboleno (majoritário), β -cariofileno e β -cubeleno. Seguindo a mesma linha de pesquisa, Veiga Junior et al. (2001), apresentaram como componentes principais para dois óleos-resinas o β -bisaboleno e para dois outros óleos o β -cariofileno, sendo também todos provenientes de espécies de *Copaifera sp*. E, ainda, Almeida et al. (2012) encontraram como constituinte majoritário para *Copaifera sp* o β -cariofileno.

Dessa forma, β -cariofileno se destaca como componente principal presente no óleo-resina de copaíba (GOMES, et al., 2008) e é considerado um marcador químico da fração de sesquiterpeno copaíba por BARBOSA et al. (2012 e 2013). No entanto, β -cariofileno está presente em muitas outras plantas. É usado como fragrâncias em perfumes e outros cosméticos devido ao seu odor. Ele também é descrito como um composto volátil emitido pelas plantas para a atmosfera, em resposta ao ataque de herbívoros ou alterações nos fatores abióticos (BARBOSA et al., 2012).

β -cariofileno, também, foi detectado em outros óleos como, por exemplo: *Piper nigrum* L. (POLITEO et al., 2006), *Lantana camara* L. (SUNDUFU et al., 2006), *Lallemantia peltata* (SEFIDKON et al., 2006), *Piper cyrtopodon* (ANDRADE et al., 2006). Uma variedade de atividades biológicas, incluindo anti-inflamatória (YOUNG et al., 2007), têm sido relatada para este sesquiterpeno.

Germacreno D é um importante precursor de outros sesquiterpenos. Ele foi relatado como o principal constituinte em amostra de óleo-resina de *C. multijuga* coletados na estação seca (BULOW & KONING, 2000). No presente trabalho, Germacreno D foi detectado em todas as amostras de *C. multijuga* (Tabela 8). Segundo Bülow e Köning (2000), Germacreno D ocorre geralmente junto com δ -cadineno, fato que também foi observado neste trabalho, pois com exceção de OCM1, todas as amostras de OCM continham o δ -cadineno.

O β -bisaboleno possui propriedades anti-inflamatória e analgésica (VEIGA JR. & PINTO, 2002). β -bisaboleno foi avaliado como o constituinte principal em amostras obtidas a partir de óleo-resina de *C. duckei* (CASCON & GILBERT, 2000; CARVALHO et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006) e *C. reticulata* (ZOGHBI et al.,

2009) mas não em *C. multijuga*. Não sendo também detectado em nenhuma das amostras de *C. multijuga* analisados neste trabalho (Tabela 8).

As variações na fração sesquiterpênica dos óleos de Copaíba são muito grandes, com as variações sazonais que ocorrem em uma espécie ou entre espécies, a diferença na composição química e na produção de tais óleos que diz respeito a variações diurnas, sazonalidade, relacionada com o diâmetro à altura do peito (DAP) e tipo de solo têm sido amplamente relatados. A variação sazonal de metabólitos secundários pode ser causada por demandas fisiológicas, tais como crescimento, defesa e reprodução; por outro lado, também pode ser causada por variações no ambiente, tais como o stress hídrico, luz, tipo de solo, falta de nutrientes, temperaturas extremas, poluição, e a presença e/ou ausência de microorganismos patogênicos. Embora esta variação parecesse ser mais sensível a fatores bióticos, tais como, lesões provocadas por insetos e fungos, que a luz e nutrientes, este tem sido relatado como um possível fator que influencia e justifica a variabilidade de substâncias na composição química dos óleos-resinas de copaíba (BARBOSA *et al.*, 2012; BARBOSA *et al.*, 2013). A sazonalidade é um fator importante para a padronização do óleo-resina de copaíba (BIAVATTI *et al.*, 2006).

Solos arenosos, pobres em nutrientes, promovem uma maior quantidade de metabólitos secundários, em comparação com solos argilosos, que são mais ricos em nutrientes. Embora que, de um modo geral, não foi encontrada nenhuma relação significativa entre o tipo de solo e da composição de óleo-resina de copaíba (HERRERO-JÁUREGUI *et al.*, 2011; BARBOSA *et al.*, 2012).

A caracterização qualitativa e quantitativa dos componentes do óleo de copaíba seria uma ferramenta apropriada à identificação e origem das diferentes espécies botânicas de copaibeiras, podendo ser também modelada para aplicar-se ao controle de qualidade dos óleos ainda no estágio inicial de comercialização (TAPPIN *et al.*, 2004).

A crescente demanda do mercado de fitoterápicos e, a ausência de critérios para o controle de qualidade compromete não só a qualidade dos óleos de copaíba, mas também a autenticidade e eficácia farmacológica de produtos que contêm esse óleo. Embora considerada uma substância terapêutica importante, a falta de informação sobre

o óleo, tais como origem e especificação química, tem sido uma das principais barreiras para a sua comercialização mais ampla, bem como sobre o quanto a variação da composição química dos sesquiterpenos e diterpenos nos óleos podem influenciar na sua atividade terapêutica e ou propriedade cosmeceútica (BARBOSA *et al.*, 2013).

Assim, a validação de métodos e a padronização química do óleo-resina de copaíba são claramente importantes, já que a composição química deste óleo está relacionada com suas atividades biológicas (CASCON & GILBERT, 2000).

5.2 Obtenção das NCs de OC

5.2.1 Obtenção das NCs de OC – Estudo piloto com óleo de *C. multijuga* Hayne

Inicialmente, foi estudado a viabilidade de se obter nanocápsulas com OCM, seguindo a técnica de deposição interfacial de polímeros pré-formados segundo Fessi et al. (1989) utilizando como solvente orgânico a acetona e como polímero a Poli- ϵ -caprolactona, mas o óleo de *C. multijuga* utilizado não foi miscível em acetona e dessa forma seguindo a metodologia descrita na literatura não houve formação de nanocápsulas. Vale destacar que para o preparado de NCs pelo método de deposição interfacial é necessário que o óleo seja miscível com o solvente orgânico utilizado (LETCHEFORD & BURT, 2007). Tentou-se, então, substituir o solvente e obter as NC utilizando como solvente orgânico o diclorometano, no qual o óleo foi inteiramente miscível, porém ao verter a fase orgânica na fase aquosa houve separação de fases.

Na tentativa de obter NC utilizando o OCM preparou-se 3 formulações: A primeira formulação, solubilizou-se 1 mL do óleo com 0,2 mL de polietilenoglicol e 4 mL de acetona e preparou-se as NC conforme método descrito previamente. A segunda, solubilizou-se 1 mL do óleo com 1 mL de metanol e 2 mL de acetona e na terceira, solubilizou-se 1 mL do óleo com 2 mL de óleo mineral e 4 mL de acetona e preparou-se as NC. Em nenhuma das experiências foi possível obter NCs uniformes, devido às mesmas apresentarem espuma em sua superfície e com isso não apresentando o aspecto homogêneo descrito para as NCs.

Nesse estudo piloto observou-se que seguindo o método de deposição interfacial de polímero pré-formado (FESSI *et al.*, 1989) não seria possível, em tempo hábil, obter NCs utilizando o óleo OCM 5, fornecido pelo Q-BIOMA, devido esse óleo não ser miscível em acetona, requisito este para obter as NCs de acordo a técnica proposta. E, também, não haveria tempo, para um estudo mais aprofundado a fim de se estabelecer as condições ideais em relação a tipo de solvente, tipo e proporção de tensoativos favoráveis à obtenção das NCs de acordo com a característica e composição química específica do OCM5 (Tabela 8).

5.2.2 Obtenção das NCs de óleo *C. reticulata* Ducke

Após estudo piloto equivalente ao descrito acima para o OCM 5, constatou-se a viabilidade de obtenção das NCs contendo óleo de *C. reticulata* Ducke, também fornecido pelo Q-Bioma, conforme o método proposto.

5.3 Avaliação da influência do tipo de polímero e concentração de óleo na obtenção das NC de óleo de *C. reticulata* Ducke

Através do planejamento fatorial do tipo 2², replicado, avaliou-se a influência dos polímeros (Poli- ϵ -caprolactona e Poli-ácido láctico co-glicólico) e diferentes concentrações do óleo (2,5 e 5,0%) no potencial zeta, no diâmetro médio de partícula e no pH das NCs obtidas, cujos resultados estão mostrados na tabela 9. A análise estatística das variáveis dependentes estudadas são mostrados através dos gráficos de Pareto (Figuras 12, 13 e 14).

Formulação	Fatores	PZ (mV) X ± s (CV%)	TP (nm) X ± s (CV%)	pH X ± s (CV%)
NC.1	PCL + 1 mL	-30,5 ± 0,6 (1,83)	187,6 ± 0,6 (0,33)	5,70 ± 0,0 (0,20)
NC.2	PLGA + 1 mL	-23,4 ± 0,8 (3,23)	172,8 ± 0,9 (0,55)	4,06 ± 0,0 (0,14)
NC.3	PCL + 2 mL	-29,0 ± 0,9 (3,19)	261,3 ± 1,0 (0,38)	5,58 ± 0,0 (0,10)
NC.4	PLGA + 2 mL	-20,9 ± 0,4 (1,99)	250,9 ± 1,8 (0,72)	3,99 ± 0,0 (0,00)
NC.5	PCL + 1 mL	-31,4 ± 0,6 (1,77)	209,4 ± 0,7 (0,31)	5,22 ± 0,0 (0,22)
NC.6	PLGA + 1 mL	-22,2 ± 0,4 (1,96)	179,7 ± 0,1 (0,06)	3,58 ± 0,0 (0,64)
NC.7	PCL + 2 mL	-22,7 ± 1,6 (5,09)	302,9 ± 3,2 (1,04)	5,26 ± 0,0 (0,33)
NC.8	PLGA + 2 mL	-23,4 ± 0,2 (0,65)	255,8 ± 0,5 (0,18)	3,55 ± 0,0 (0,33)

Tabela 9 – Resultados do Potencial Zeta (PZ), Diâmetro médio de partícula (TP) e Índice de Polidispersão (IPD) para o planejamento fatorial do tipo 2²

Como pode ser visto na figura 12, o fator A (representado pelos tipos de polímeros) apresentou diferença estatística significativa no que se refere ao PZ. O volume de OCR (fator B) e a interação entre fator A e B não foram estatisticamente significantes.

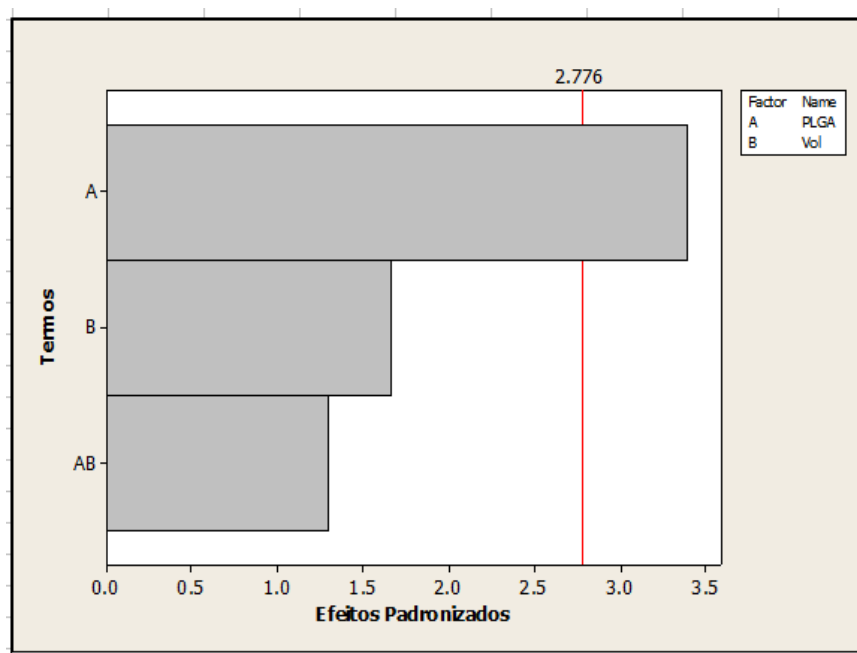


Figura 12 – Gráfico de Pareto mostrando a influência do tipo de polímero (A) e do volume de óleo de copaíba (B) sobre o potencial zeta (PZ) encontrado nas NCs de OCR

Para o TP das NCs, pode ser visualizado que apenas o fator B (volume de OCR) foi estatisticamente significativa, uma vez que a ANOVA demonstrou que para um $\alpha < 0,05$, nem o fator A (tipo de polímeros) e nem a interação entre os fatores foi importante para esta resposta estudada (Figura 13).

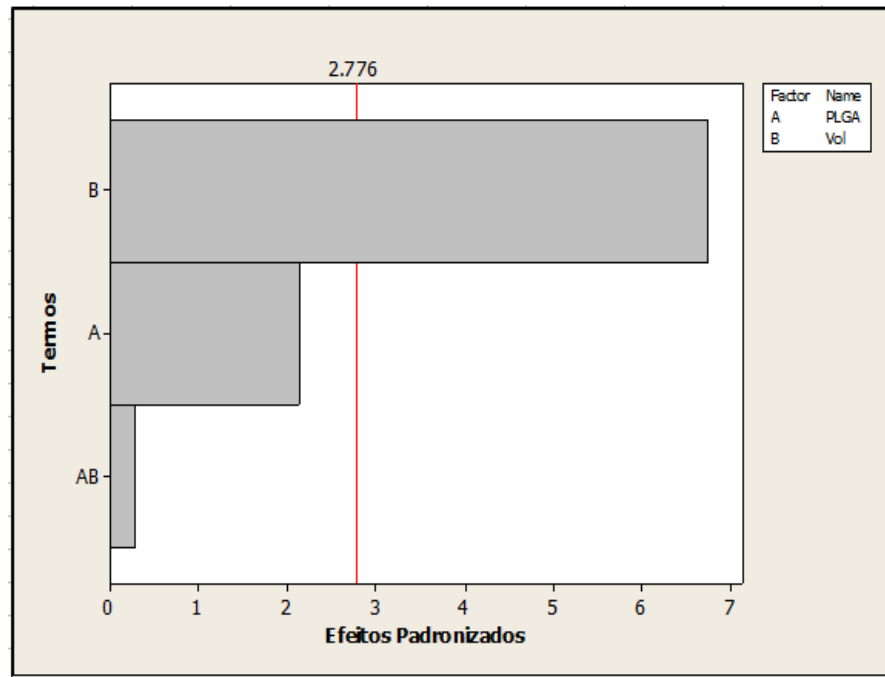


Figura 13 – Gráfico de Pareto mostrando a influência do tipo de polímero (A) e do volume de óleo de copaíba (B) sobre o tamanho de partícula (TP) encontrado nas NCs de OCR

Conforme a figura 14, observa-se que o fator B (volume de OCR) não foi significativo, estatisticamente, sobre os valores de pH das NCs, porém o fator A (tipo de polímero) foi estatisticamente significativo, igual ao ocorrido para o PZ das NCs.

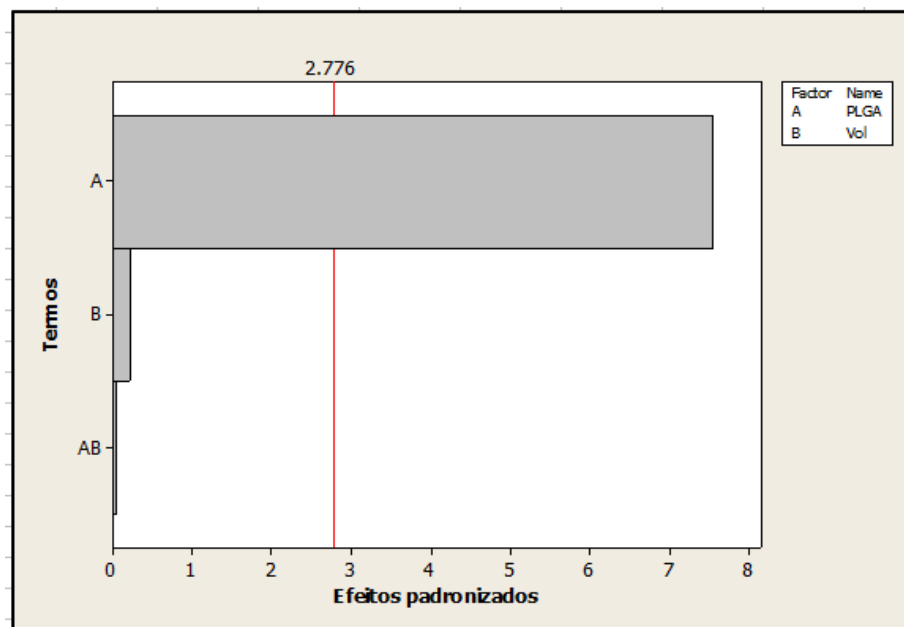


Figura 14 – Gráfico de Pareto mostrando a influência do tipo de polímero (A) e do volume de óleo de copaíba (B) sobre o pH encontrado nas NCs de OCR

5.4 Avaliação das suspensões de NC contendo óleo de *C. reticulata* Ducke

A estabilidade físico-química é um fator importante que deve ser levado em consideração quando se aborda o tema nanocápsulas, visto que quanto maior a estabilidade das suspensões coloidais, maior o potencial de aplicabilidade no mercado cosmético e farmacêutico. Por tratar-se de formas líquidas, as suspensões coloidais podem apresentar sedimentação ou agregação de partículas, além da degradação química dos componentes da formulação (MAGENHEIM E BENITA, 1991; ANGELI, 2007).

5.4.1 Teste de centrifugação

Na avaliação macroscópica, as nanocápsulas apresentaram aspecto leitoso, homogêneo, sem formação de precipitado e nem separação de fases (Figura 15). Após o teste de centrifugação as nanocápsulas apresentaram a formação de pequeno precipitado, podendo indicar baixa estabilidade (Figura 16).



Figura 15 – Aspecto macroscópico nanocápsulas



Figura 16 – Teste de centrifugação

5.4.2 Distribuição do tamanho médio das partículas e índice de polidispersão

As determinações dos diâmetros médios das partículas e os índices de polidispersão das NCs, durante os 4 meses estudados são mostrados nas figura 17 e 18, respectivamente.

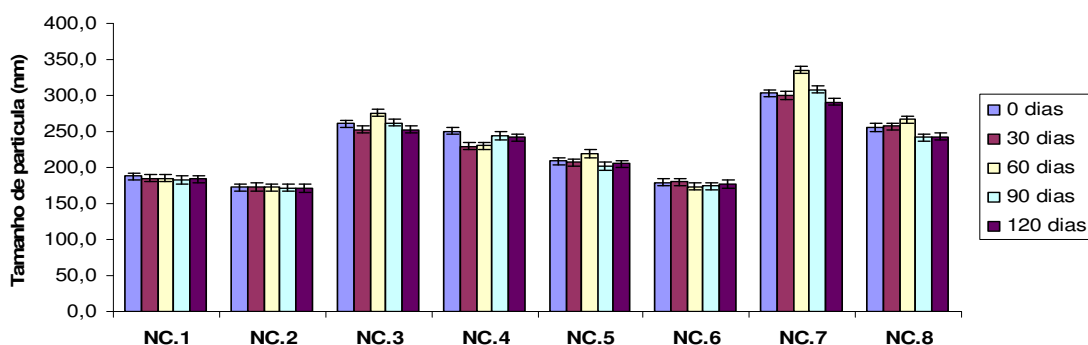


Figura 17 – Diâmetros médios das partículas das NCs durante 4 meses. Onde: NC: Nanocápsulas

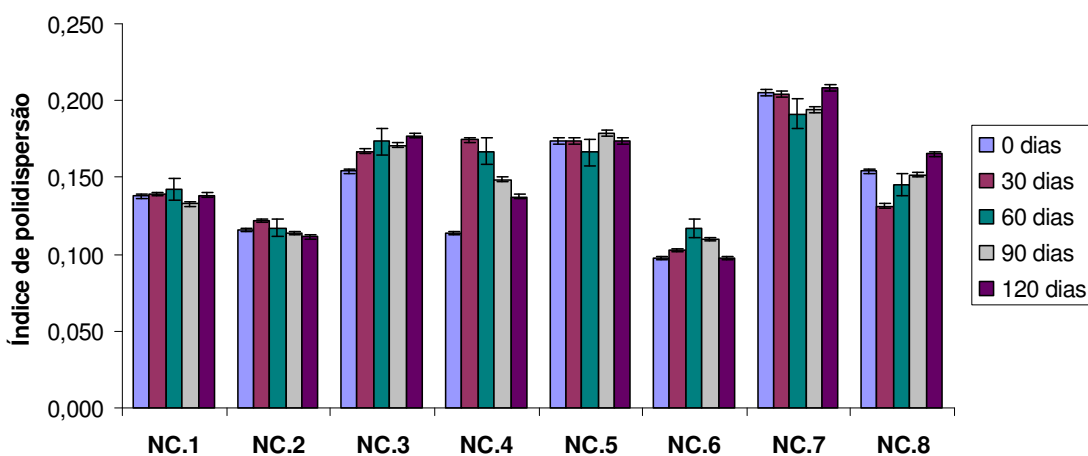


Figura 18 – Índices de polidispersão das NCs durante 4 meses. Onde: NC: Nanocápsulas

Como mostrado nas figuras 17 e 18, os diâmetros médios de partículas e os índices de polidispersão (IPD) mantiveram-se dentro dos parâmetros esperados para nanocápsulas, ressaltando que as NCs estavam em escala nanométrica. As NCs contendo menor porcentagem de óleo (2,5%) apresentaram menores diâmetros médios de partículas e IPD, mostrando que a quantidade de óleo influenciou no tamanho das partículas. Observou-se que as NCs que eram compostas pelo polímero PCL

apresentaram diâmetro médio de partículas superiores e IPD superiores as que eram compostas pelo polímero PLGA. Houve diferença estatística significativa entre os grupos de NCs ($p < 0,05$) e não houve diferença significativa entre a avaliação preliminar de estabilidades das NCs durante os meses avaliados. Mostrando que nesse estudo preliminar de estabilidade, não houve uma degradação significativa nas NCs armazenadas em geladeira, indicando ser estável, pelo período avaliado.

As NCs apresentaram uma distribuição monomodal, com um baixo índice de polidispersão (Figura 19). Geralmente, as nanopartículas, mesmo preparadas através de diferentes métodos, apresentam diâmetros médios entre 100 e 300 nm (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). As NCs contendo OCR obtidas neste trabalho apresentaram tamanho médio de partícula variando de 174,4 a 307,8 nm.

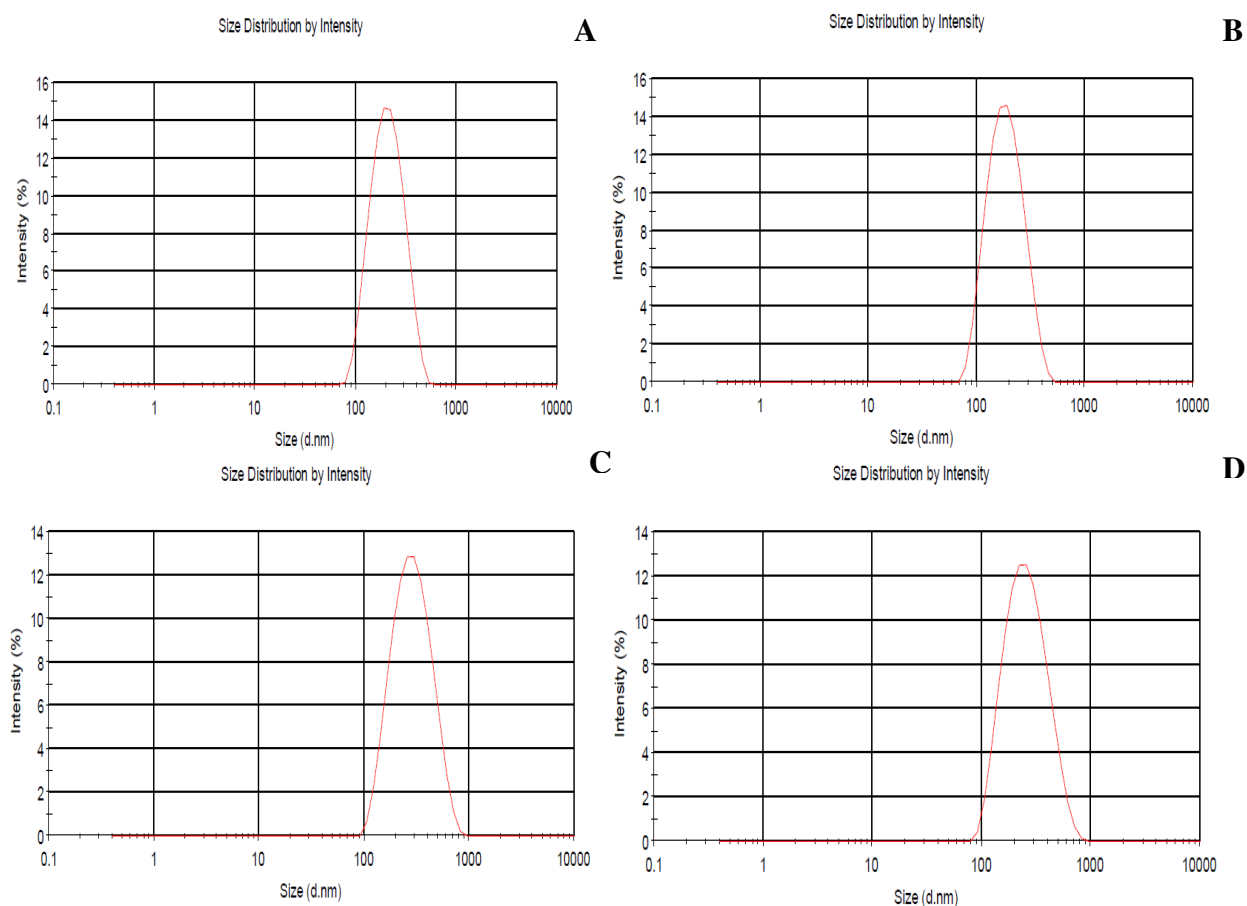


Figura 19 – Distribuição monomodal da Nanocápsulas. Onde: A- Nanocápsula 1 (NC.1), B – Nanocápsula 2 (NC.2), C – Nanocápsula 3 (NC.3), D – Nanocápsula 4 (NC.4).

Parâmetros como a velocidade de agitação utilizada no momento de preparação das nanopartículas e fatores de formulação (quantidades de polímero e tensoativos e volume do solvente orgânico) são capazes de influenciar no tamanho das nanocápsulas preparadas com poli- ϵ -caprolactona (SANTOS-MAGALHÃES *et al.*, 2000; ANGELI, 2007).

Tendência à agregação e sedimentação das nanopartículas dispersas, em função do tempo, pode ser monitorada pela determinação de mudanças na distribuição de tamanho de partículas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). No presente estudo, houve pequena mudança na distribuição do tamanho de partículas, porém esse resultado não necessariamente indica tendência à agregação, visto que não foi uma mudança significativa.

5.4.3 Potencial Zeta

Os resultados para o potencial zeta das NCs são mostrados na figura 20. O Potencial Zeta reflete o potencial elétrico de partículas e é influenciado pela composição da partícula e o meio no qual ele está disperso (LOBATO *et al.*, 2013).

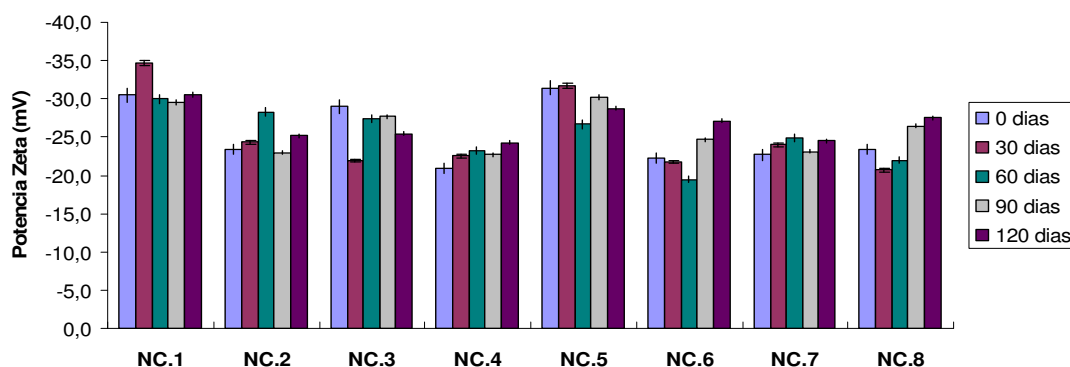


Figura 20 – Potencial Zeta das NCs durante 4 meses. Onde: NC: Nanocápsulas

Conforme figura 20, observa-se que as NCs apresentaram PZ próximo de -30 mV, valor esse considerado ideal para que as NCs mantenham a estabilidade e tipicamente observados para esses sistemas (MELO *et al.*, 2012). As NCs compostas por PCL apresentaram PZ superiores as compostas por PLGA. As NCs que continham

menor concentração de óleo apresentaram os melhores potenciais zeta, sendo que a composta por PLC e 2,5% de óleo apresentou o PZ mais próximo de -30 mV frente às demais NCs. Não houve relação estatística significativa entre os meses analisados, porém houve diferença significativa entre os diferentes tipos de NCs.

A carga da superfície das partículas coloidais pode surgir por uma série de fatores, como exemplo, a ionização de grupos químicos sobre a superfície ou a adsorção de íons. No caso de nanocápsulas de PLGA a carga negativa é devido à ionização dos grupos carboxílicos das cadeias do polímero sobre a superfície (MORAES *et al.*, 2009).

Em módulo, um valor de potencial zeta relativamente alto é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes. A determinação do potencial zeta também pode ser útil na elucidação do mecanismo de associação de fármacos às nanopartículas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

5.4.4 Determinação do pH

A determinação do pH está mostrada na figura 21.

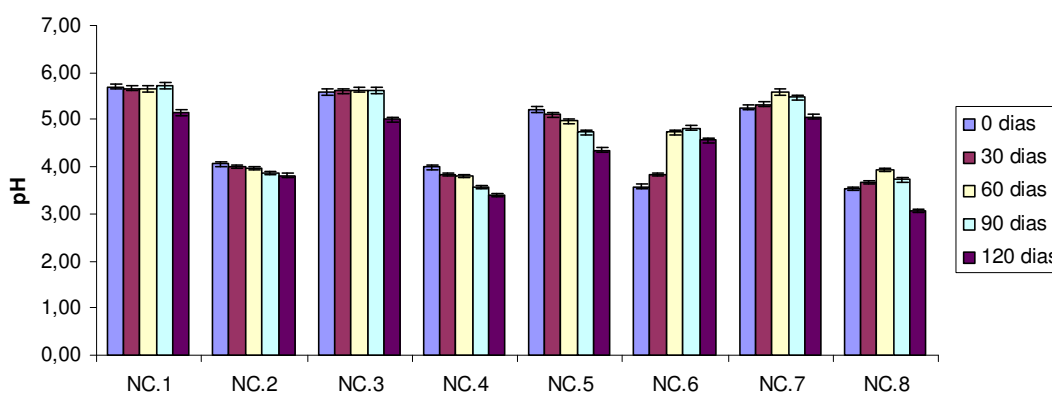


Figura 21 – Determinação do pH das NCs durante 4 meses. Onde: NC: Nanocápsulas

De acordo com a figura 21, as NCs compostas por PCL (NC1, NC3, NC5 e NC7) apresentaram valor de pH superior (próximo a 6) ao encontrado para o PLGA (próximo a 4). Não houve diferença significativa entre os valores de pH nos meses avaliados e houve diferença significativa no pH entre os diferentes tipos de NCs. Para

algumas NCs houve uma pequena diminuição no valor do pH, podendo estar associada à degradação dos componentes da formulação ou pode ser atribuída tanto à ionização de grupos carboxílicos presentes no polímero, quanto à hidrólise.

O pH de aproximadamente 4,0 encontrado para as NCs contendo PLGA foram semelhante ao encontrado por Melo et al. (2012). As suspensões de nanocápsulas de indometacina apresentaram valores reduzidos de pH durante o armazenamento (3 meses) que variaram de $4,2 \pm 0,1$ para $3,4 \pm 0,0$ e $3,2 \pm 0,0$ à temperatura ambiente de 50 °C (POHLMANN *et al.*, 2002).

Os resultados apresentados nesse trabalho para os parâmetros físico-químicos descritos acima para as NCs são semelhantes aos resultados encontrados por Moraes et al. (2009) que utilizaram PLGA como polímero na preparação de NCs de benzocaína e de acordo com o de Melo et al. (2012) que utilizaram PLGA, PCL e PLA como polímeros na preparação de NCs de benzocaína.

5.4.5 Avaliação do comportamento reológico

A viscosidade de uma suspensão é importante porque as propriedades reológicas afetam todas as etapas de fabricação e são ferramentas valiosas no controle de qualidade (LOBATO *et al.*, 2013). O comportamento da suspensão de nanocápsulas avaliadas neste estudo é típico de um fluido Newtoniano, uma vez que o aumento da tensão de cisalhamento foi proporcional ao aumento da taxa de cisalhamento (Figura 22). Não houve diferença significativa entre as NCs apresentando viscosidade de aproximadamente 1 Pa (Figura 23).

Lobato et al. (2013) também encontraram comportamento Newtoniano para nanocápsulas de bixina utilizando como polímero PCL.

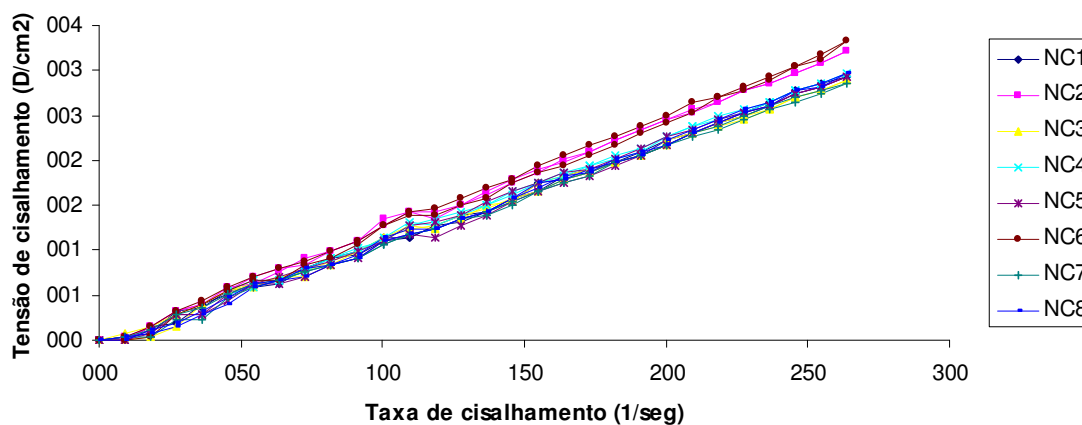


Figura 22 - Comportamento reológico para as nanocápsulas a 25 °C

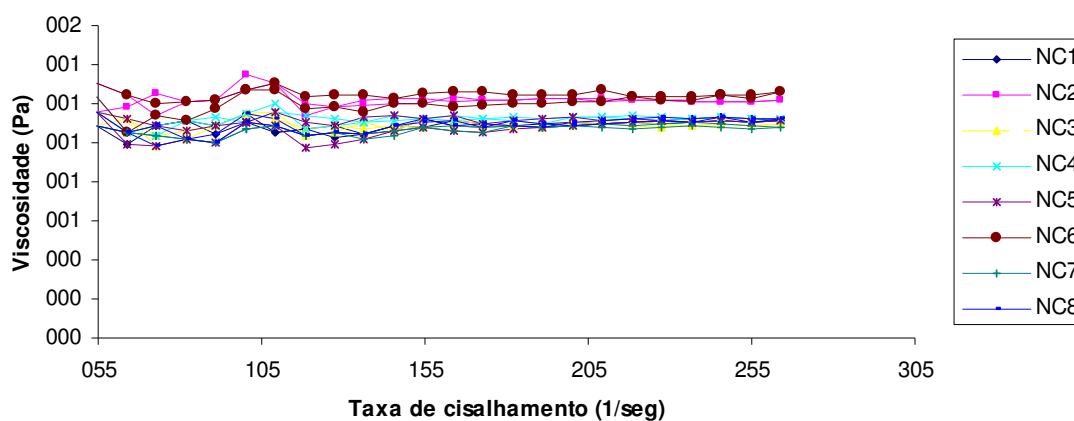


Figura 23 - Diagrama de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para as nanocápsulas a 25 °C

5.4.6 Microscopia de força atômica (AFM)

A alta resolução da imagem obtida, a facilidade na preparação de amostras para análise e a disponibilidade de instrumentos comerciais de alta qualidade fazem da microscopia de força atômica uma poderosa ferramenta para o estudo de materiais (HERRMANN *et al*, 1997).

As NCs foram analisadas no microscópio de força atômica, e na figura 24 são mostradas as fotomicrografias da NC.1, essa foi escolhida por ter apresentado as fotomicrografias com melhor resolução frente às demais.

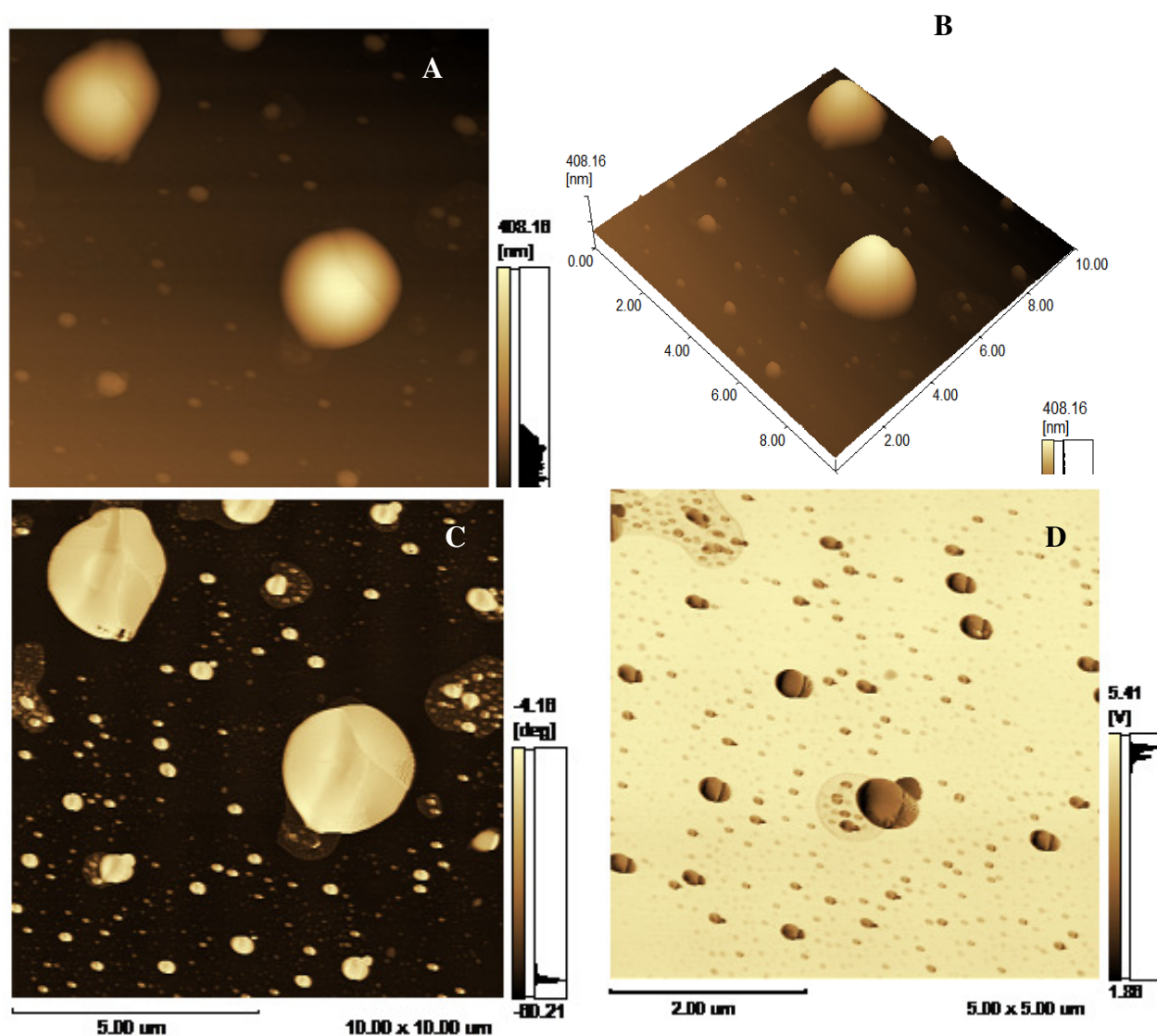


Figura 24 - Fotomicrografia da Nanocápsula 1 pelo AFM. Onde: A – Altura em 2D; B – Altura em 3D

5.4.7 Taxa de encapsulação

Para a realização da taxa de encapsulação, dada à dificuldade de se encontrar um padrão comercial de β -bisaboleno, foi selecionado como padrão o diterpeno ácido caurenóico. Esse padrão já havia sido detectado anteriormente nessa mesma amostra de OCR em estudo realizado pelo grupo de pesquisa no Laboratório de Física Industrial – USP- FCFRP (dados ainda não publicados).

5.4.7.1 Condições cromatográficas

Foi realizada a injeção de 200 µg do padrão AC e verificou-se a eluição cromatográfica no tempo de retenção de 21,870 minutos pode ser vista na figura 25.

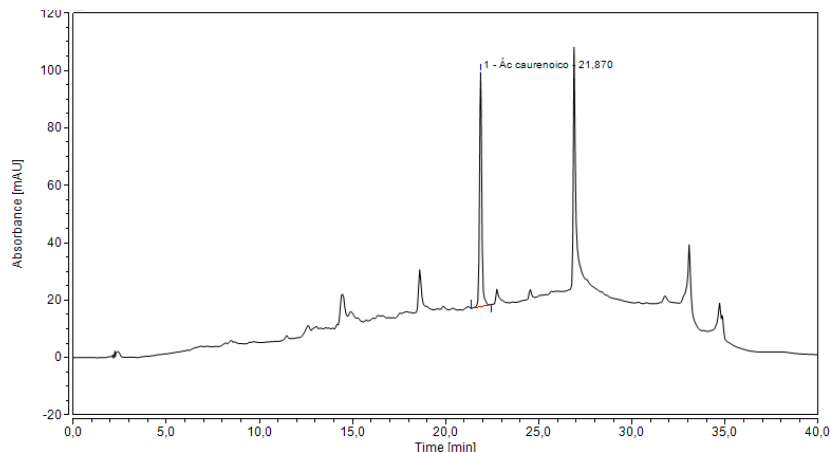


Figura 25 - Perfil cromatográfico do padrão ácido caurenóico em 254 nm.

Posteriormente, foi realizada a injeção do OCR e comparando o cromatograma (Figura 26) com o padrão AC foi possível confirmar a presença do AC no OCR.

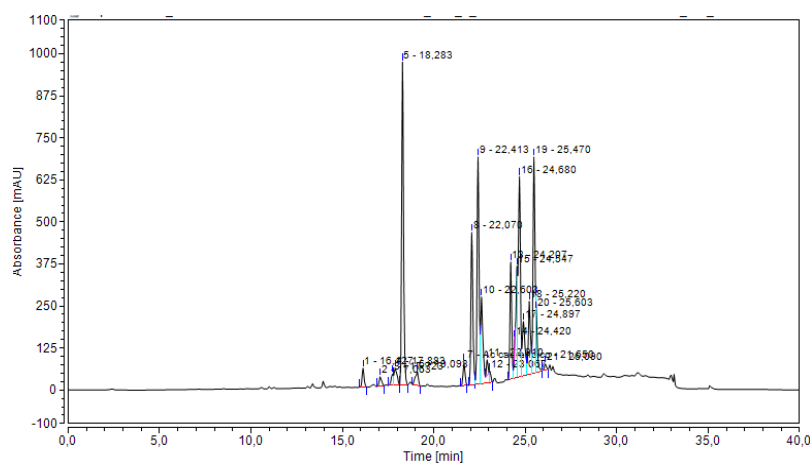


Figura 26 - Eluição cromatográfica do óleo de *C. reticulata* Ducke em 254 nm.

5.4.7.2 Curva de calibração do ácido caurenóico (AC)

A linearidade foi determinada através da construção de curva de calibração para o padrão ácido caurenóico (Figura 27). Pode ser observado, que a curva do AC apresenta coeficiente de regressão de 0,9989, demonstrando significância na linearidade.

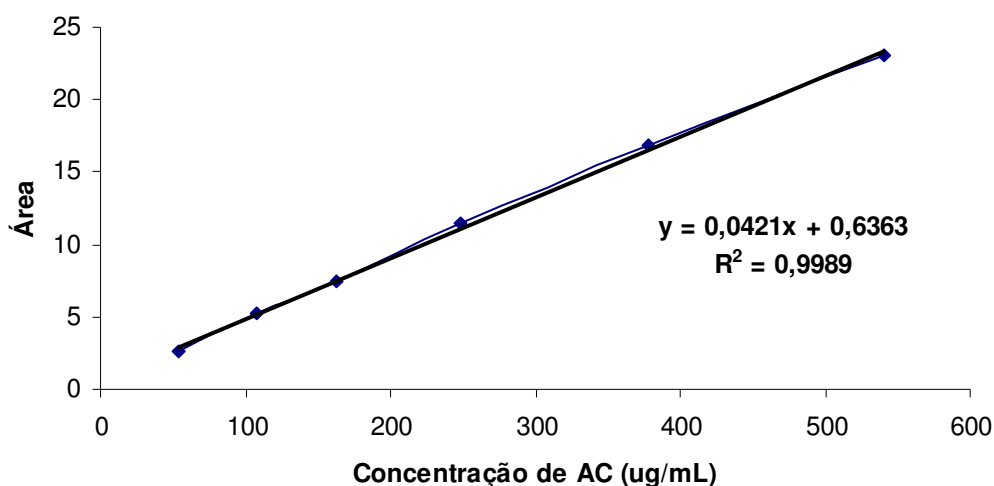


Figura 27 - Curva de calibração do ácido caurenóico

5.4.7.3 Limite de detecção e Limite de quantificação

O limite de detecção calculado para o AC foi de 0,09 $\mu\text{g/mL}$ e o limite de quantificação foi de 0,31 $\mu\text{g/mL}$.

5.4.7.4 Repetibilidade

As amostras de AC apresentaram valor de repetibilidade com coeficiente de variação abaixo de 5% o que demonstra a precisão do método analisado (Tabela 10).

Concentração	Ácido caurenóico (mAU) $\bar{X} \pm s$ (CV %)
3,5 mg/mL	9,79 \pm 0,30 (3,04)
5,2 mg/mL	12,19 \pm 0,60 (4,94)
5,7 mg/mL	13,86 \pm 0,43 (3,12)
7,9 mg/mL	18,51 \pm 0,27 (1,47)

Tabela 10 - Repetibilidade do padrão ácido caurenóico

5.4.7.5 Taxa de encapsulação das NCs

A taxa de encapsulação das NCs (Tabela 11) mostrou que o método empregado para obtenção de NCs contendo OCR permitiu uma boa encapsulação (acima de 80%) da substância selecionada como marcador químico, o AC. Com relação ao tipo de polímero empregado, a taxa de encapsulação foi superior para o PLGA (NC.2, NC.4, NC.6 e NC.8) e no que se refere a concentração de óleo observou-se que a quantidade encapsulada foi praticamente a mesma, em geral sendo um pouco superior para as NCs que continham 2,5% de óleo.

Nanocápsulas	Eficiência de Encapsulação (%)
NC.1	84,96
NC.2	95,27
NC.3	82,75
NC.4	95,03
NC.5	95,43
NC.6	97,83
NC.7	117,63
NC.8	89,65

Tabela 11 – Eficiência de encapsulação das nanocápsulas

Esses resultados indicam que o óleo estava presente na estrutura na nanocápsula (parte interna ou parede polimérica).

Portanto, avaliando o custo-benefício dos polímeros e da quantidade de óleo, apesar de as NCs de PLGA apresentarem uma taxa de encapsulação maior que a do PCL, o PLGA apresenta um custo muito superior ao PCL. O polímero PCL é biocompatível, biodegradável, e não gera compostos tóxicos; além disso, ele é aprovado pelo FDA (Food and Drugs Administration) para estudos específicos e tem custos semelhantes em comparação com outros polímeros sintéticos (LOBATO *et al.*, 2013).

Sendo assim, sugere-se que o polímero PCL seja escolhido como polímero para uso nesse sistema de nanocápsulas e que a quantidade de óleo utilizada seja de 2,5%.

Os valores encontrados para a taxa de encapsulação nesse trabalho foram superiores aos valores encontrados para NCs de benzocaina (aproximadamente 70%, por Melo et al. (2012). Resultado semelhante ao do presente trabalho foi encontrado na microencapsulação de bixina utilizando diferentes polímeros, os quais resultaram em uma eficiência de encapsulação de 86,4% (BARBOSA *et al.*, 2005).

As formulações preparadas com PCL (SCHAFFAZICK *et al.*, 2002) apresentaram 100% de associação do diclofenaco às partículas coloidais, em função de não ter sido detectada quantidade de fármaco no ultrafiltrado, fato também observado para nanopartículas de diclofenaco relatado por Guterres et al. (1995).

Existem muitos fatores que podem afetar a eficiência de encapsulação das nanocápsulas como, por exemplo, a quantidade de polímero ou de surfactante, as características da superfície das partículas ou a natureza do polímero e o volume da fase oleosa (MORAES *et al.*, 2009).

6 CONCLUSÃO

- O estudo de caracterização físico-química dos óleos de *Copaifera multijuga* Hayne e *Copaifera reticulata* Ducke mostrou que há uma diferença significativa entre alguns parâmetros observados principalmente entre as espécies de óleos. Vale destacar o perfil cromatográfico entre eles, onde observou-se a variabilidade entre os constituintes dos óleos de uma mesma espécie e entre as espécies e que o constituinte majoritário para o óleo de *C. reticulata* foi o β -bisaboleno e para os diferentes óleos de *C. multijuga* o composto principal foi o β -cariofileno.
- O índice de refração pode ser um parâmetro para determinar especificações para o controle de qualidade de diferentes espécies de Copaíba. E, inclusive diferença entre elas, considerando que o mesmo OCR coletado em 2012 e caracterizado em 2014, praticamente não alterou seu índice de refração.
- Não foi possível obter nanocápsulas contendo óleo de *C. multijuga*, pois este óleo não é miscível no solvente orgânico utilizado (acetona).
- No presente estudo, a preparação e a caracterização de nanocápsulas contendo óleo de *C. reticulata* Ducke apresentaram bons parâmetros para esse sistema nanoparticulado. Apresentando inclusive estabilidade preliminar durante os meses estudados quando armazenadas em geladeira ($\sim 4^{\circ}\text{C}$), pois nenhuma diferença significativa foi observada para os parâmetros analisados.
- As nanocápsulas contendo 2,5% de óleo de Copaíba e formadas pelo polímero poli- ϵ -caprolactona (PCL) apresentaram os melhores parâmetros físico-químicos em geral e custo-benefício frente às nanocápsulas preparadas com o polímero poli D, L-ácido láctico-co-glicólico (PLGA).
- Ao se avaliar a influência do tipo polímero na obtenção das suspensões de nanocápsulas contendo óleo de *C. reticulata* observou-se que o tipo de polímero utilizado (PCL ou PLGA) apresentou relação estatística significativa nos valores de

potencial zeta e pH, enquanto que a concentração de óleo (2,5 e 5,0%) não apresentou relação estatística significativa. Porém, somente a concentração do óleo teve relação estatística significativa no tamanho de partícula.

- Foi possível obter nanocápsulas contendo óleo de *C. reticulata* Ducke dentro de parâmetros aceitáveis, os quais necessitam ainda ser otimizados para posteriormente proporcionar a elaboração futura de uma forma farmacêutica.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. R. et al. Genotoxicity assessment of Copaiba oil and its fractions in Swiss mice. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 3, p. 664-672, 2012.

ALVES, M. P. Formas farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões de nimesulida: desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea in vitro. 183p. 2006. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Porto Alegre.

ALVES, M. P. et al. Rheological Behavior of Semisolid Formulations Containing Nanostructured Systems. In: Beck, R.; Guterres, S.; Pohlmann, A. **Nanocosmetics and Nanomedicines: New Approaches for Skin Care**. Índia. Springer, 2011.

ANDRADE, E. H. A. et al. Essential Oil Composition of *Piper cyrtopodon* (Miq.) C. DC. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 9, n. 1, p. 53-59, 2006.

ANGELI, V. W. Desenvolvimento e caracterização de formulações fotoprotetoras contendo nanocápsulas. 208p. 2007. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Farmácia.

ARAÚJO, F. A. A. et al. Efeito do óleo de copaíba nas aminotransferases de ratos submetidos à isquemia e reperfusão hepática com e sem pré-condicionamento isquêmico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 93-99, 2005.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2008.

BADKE, M. R. et al. Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. **Texto Contexto Enfermagem**, v. 21, n. 2, p. 363-370, 2012.

BASILE, A. C. et al. Anti-inflammatory activity of oleoresin from Brazilian *Copaifera*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, p. 101-109, 1988.

BARBOSA, M. I. M. J. et al. Light stability of spray-dried bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparations. **Food Research International**, v. 38, p. 989-994, 2005.

BARBOSA, K. S et al. Detection of adulterated copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil-resins by refractive index and thin layer chromatography. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1A, p. 57-60, Jan./Mar. 2009.

BARBOSA, P. C. S. et al. Influence of Abiotic Factors on the Chemical Composition of Copaiba Oil (*Copaifera multijuga* Hayne): Soil Composition, Seasonality and Diameter at Breast Height. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 10, p. 1823-1833, 2012.

BARBOSA, P. C. S. et al. Phytochemical Fingerprints of Copaiba Oils (*Copaifera multijuga* Hayne) Determined by Multivariate Analysis. **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, p. 1350-1360, 2013.

BIAVATTI, M. W. et al. Análise de óleos-resinas de copaíba: contribuição para o seu controle de qualidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 16, v. 2, p. 230-235, Abr./Jun., 2006.

BRITO, N. M. B. et al. Efeito do óleo de copaíba na cicatrização de feridas cutâneas abertas de ratos. **Revista Paranaense de Medicina**, v.12, n.1, p.28-32, 1998.

BRITO, N. M. B. et al. Aspectos microscópicos da cicatrização de feridas cutâneas abertas tratadas com óleo de copaíba em ratos. **Revista Paranaense de Medicina**, v.13, n.1, p.12-17, 1999.

BRITO, N. M. B. et al. Aspectos Morfológicos e Morfométricos do Colo Uterino de Ratas Ooforectomizadas após Aplicação de Óleo de Copaíba. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 22, n. 8, 2000.

BRITO, M. V. H. et al. Efeito do óleo de copaíba nos níveis séricos de uréia e creatinina em ratos submetidos à síndrome de isquemia e reperfusão renal. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n. 3, p. 243-246, 2005.

BRITO, N. M. B. et al. The effect of copaiba balsam on Walker 256 carcinoma inoculated into the vagina and uterine cervix of female rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 176-180, 2010.

BROCK, J. et al. Determinação experimental da viscosidade e condutividade térmica de óleos vegetais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 564-570, Jul./Set., 2008.

BÜLOW, N.; KÖNIG, W. A. The role of germacene D as a precursor in sesquiterpene biosynthesis: investigations of acid catalyzed, photochemically and thermally induced rearrangements. **Phytochemistry**, v. 55, p. 141 -168, 2000.

CARVALHO, J. C. T. et al. Topical Antiinflammatory and Analgesic Activities of *Copaifera duckei* Dwyer. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 946-950, 2005.

CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 773-778, 2000.

CASTRO-e-SILVA, O. et al. Antiproliferative Activity of *Copaifera duckei* Oleoresin on Liver Regeneration in Rats. **Phytotherapy Research**, n. 18, p. 92-94, 2004.

CAVALCANTI, B. C. et al. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 388-392, 2006.

CORREIA, A. F. et al. Amazonian plant crude extract screening for activity against multidrug-resistant bacteria. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 12, p. 369-380, 2008.

COUVREUR, P. et al. Nanocapsule technology: a review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, n. 19, v. 2, p. 99-134, 2002.

CURIO, M. et al. Acute effect of *Copaifera reticulata* Ducke copaiba oil in rats tested in the elevated plus-maze: an ethological analysis. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, n. 8, p. 1105-1110, 2009.

DEUS, R. J. A. et al. Efeito fungitóxico in vitro do óleo-resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 3, p. 347-353, 2009.

DEUS, R. J. A. et al. Avaliação do efeito antifúngico do óleo-resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 1, p. 1-7, 2011.

DIAS, D. O. et al. Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of β -caryophyllene in a nanoemulsion dosage form prepared with copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil. **Analytica Chimica Acta**, v. 721, p. 79-84, 2012.

DIMER, F. A. et al. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1520-1526, 2013.

DOMINGUES, G. S. Caracterização físico-química e avaliação dos perfis de liberação in vitro de micropartículas revestidas com nanocápsulas poliméricas. 161p. 2006. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Farmácia. Porto Alegre.

DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. “**Nanotecnologia**”. São Paulo, Art Líber, p.1-201, 2006.

ESTEVÃO, L. R. M. et al. Neoangiogênese de retalhos cutâneos em ratos tratados com óleo de copaíba. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 4, p. 406-412, abr., 2009.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5 Edição. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

FERNANDES R. M. et al. Anti-inflammatory activity of copaiba balsam (*Copaifera cearensis*, Huber). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 73, p. 53-56, 1992.

FERNANDES, F. D. F.; FREITAS, E. P. S. Acaricidal activity of an oleoresinous extract from *Copaifera reticulata* (Leguminosae: Caesalpinioideae) against larvae of the southern cattle tick, *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 150-154, 2007.

FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p. R1-R4, 1989.

FREIRE, A. P. F. et al. Utilização do óleo-resina de Copaíba (*Copaifera paupera*) no tratamento preservativo da espécie Sumaúma (*Ceiba pentandra*). **Amazônia: Ciência & Desenvolvimento**, v. 7, n. 13, Jul./Dez., 2011.

GARCIA, R.; YAMAGUCHI, M. Óleo de Copaíba e suas Propriedades Medicinais: Revisão Bibliográfica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 5, n. 1, p. 137-146, 2012.

GERIS, R. et al. Diterpenoids from *Copaifera reticulata* Ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 1, p. 25-28, 2008.

GOMES, N. M. et al. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 486-492, 2007.

GOMES, N. M. et al. Antineoplastic activity of *Copaifera multijuga* oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich tumor. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 179-184, 2008.

GOMES, N. M. et al. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of fractions obtained from *Copaifera multijuga* Hayne, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 1, p. 177-183, 2010.

GUTERRES S. S., et al. Poly(D,L-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 113, n. 1, p. 57 – 63, 1995.

GUTERRES, S. S. et al. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocápsulas, for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.

HERRMANN, P. S. P. et al. Microscopia de Varredura por Força: uma Ferramenta Poderosa no Estudo de Polímeros. **Polímeros**, v. 7, n. 4, p. 51-61, 1997.

HERRERO-JÁUREGUI, C. et al. Chemical Variability of *Copaifera reticulata* Ducke Oleoresin. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, p. 674-685, 2011.

JÄGER, A. et al. Physico-chemical characterization of nanocapsule polymeric wall using fluorescent benzazole probes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 338, p. 297-305, 2007.

KANIS, L. A. et al. Larvicidal activity of *Copaifera* sp. (Leguminosae) oleoresin microcapsules against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Parasitology Research**, v. 110, p. 1173-1178, 2012.

KIM, J. et al. Correlation of fatty acid composition of vegetable oils with rheological behaviour and oil uptake. **Food Chemistry**, n. 118, p. 398–402, 2010.

LAI, F. et al. *Artemisia arborescens* essential oil-loaded solid lipid nanoparticles for potential agricultural applications: preparation and characterization. **AAPS PharmSciTech**, n. 7, v. 1, p. E1 – E9, 2006.

LEANDRO, L. M. et al. Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 3866-3889, jan. 2012.

LETCHFORD, K.; BURT. H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, n.3, p. 259-269, 2007.

LIMA, S. R. M. et al. *In vivo* and *in vitro* studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 9, p. 1048-53, nov., 2003.

LIMA, M. R. F. et al. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 137-147, 2006.

LIMA, C. S. et al. Pre-clinical validation of a vaginal cream containing copaiba oil (reproductive toxicology study). **Phytomedicine**, v. 18, n. 12, p. 1013-1023, 2011.

LOBATO, K. B. S. et al. Characterisation and stability evaluation of bixin nanocapsules. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3906-3912, 2013.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MACIEL, H. P. F.; GOUVEA, C. M. C. P. Extraction, purification and biochemical characterization of a peroxidase from *Copaifera langsdorffii* leaves. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1067-1071, 2007.

MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. **STP Pharma Sciences**, v. 1, n. 4, p. 221-241, 1991.

MAISTRO, E. L. et al. *In vivo* evaluation of the mutagenic potential and phytochemical characterization of oleoresin from *Copaifera duckei* Dwyer. **Genetics and Molecular Biology**, v. 4, p. 833-838, 2005.

MARTINS-DA-SILVA, R. C. V.; PEREIRA, J. F.; LIMA, H. C. de. O gênero *Copaifera* (Leguminosae-Caesalpinioideae) na Amazônia brasileira. **Rodriguésia**, v.59, p.455-476, 2008.

MASKAN, M. Change in colour and rheological behaviour of sunflower seed oil during frying and after adsorbent treatment of used oil. **European Food Research and Technology**, v. 218, p. 20–25, 2003.

MEDEIROS, R. D. Sustentabilidade de Extração, Produção e Características Químicas do óleo-resina de Copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne), Manaus-AM. 83p. 2006. Dissertação (Mestrado). Programa Integrado de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais. Manaus.

MELO, N. F. S. et al. Benzocaine-Loaded Polymeric Nanocapsules: Study of the Anesthetic Activities. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 101, n. 3, p. 1157-1165, 2012.

MENDONÇA, F. A. C. et al. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 629-636, 2005.

MENDONÇA, D. E.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaiba – *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 577-581, 2009.

MERFORT, I. Review of the analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpene lactones. **Journal of Chromatography A**, v. 967, p. 115–130, 2002.

MONTGOMERY, D. C. *Diseño y análisis de experimentos*. México: Iberoamérica, 1991.

MORAES, C. M. et al. Benzocaine loaded biodegradable poly-(D,L-lactide-co-glycolide) nanocapsules: factorial design and characterization. **Materials Science and Engineering B**, v. 165, p. 243–246, 2009.

MORETTI, M. D. L. et al. Essential oil formulations useful as a new tool for insect pest control. **AAPS PharmSciTech**, v. 3, n. 2, p. 64-74, 2002.

NOGUEIRA-NETO, J. et al. Changes in the volume and histology of endometriosis foci in rats treated with copaiba oil (*Copaifera langsdorffii*). **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 26, Suppl. 2, p. 20-24, 2011.

OHSAKI, A. et al. The isolation and *in vivo* potent antitumor activity of clerodane diterpenoid from the oleoresin of the Brazilian medicinal plant, *Copaifera langsdorffii*

desfon. **Bioorganics and Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 4, p. 2889–2892, 1994.

OLIVEIRA, E. C. P. et al. Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp.) no município de Moju, PA. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 3, p. 14-23, 2006.

OLIVEIRA, D. F. et al. Antibacterial activity of plant extracts from Brazilian southeast region. **Fitoterapia**, v. 78, p. 142-145, 2007.

OLIVEIRA, R. V. M. et al. In vitro evaluation of copaiba oil as a kojic acid skin enhancer. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 2, p. 363-370, 2010.

PACHECO, T. A. R. C. et al. Antimicrobial activity of copaiba (*Copaifera* spp) balsams. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, p. 123-124, 2006.

PANYAM, J.; LABHASETWAR, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p.61-71, 2012.

PAIVA, L. A. F. et al. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, n. 1, p. 73-78, 1998.

PAIVA, L. A. F. et al. Investigation on the Wound Healing Activity of Oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in Rats. **Phytotherapy Research**, v. 16, p. 737-739, 2002.

PAIVA, L. A. F. et al. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascular Pharmacology**, v. 39, p. 303-307, 2003.

PAIVA, L. A. F. et al. Attenuation of ischemia / reperfusion-induced intestinal injury by oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Life Sciences**, v. 75, p. 1979-1987, 2004a.

PAIVA, L. A. F. et al. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. **Journal of Ethnopharmacology** v. 93, n. 1, p. 51-56, 2004b.

PARVEEN, S. et al. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 8, n. 2, p. 147-166, 2012.

PIERI, F. et al. Óleo de copaiba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 465-472, 2009.

PIERI, F. A. et al. Antimicrobial activity of autoclaved and non autoclaved copaiba oil on *Listeria monocytogenes*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 8, p. 1797-1801, 2010a.

PIERI, F. A. et al. Efeitos clínicos e microbiológicos do óleo de copaíba (*Copaifera officinalis*) sobre bactérias formadoras de placa dental em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 3, p. 578-585, 2010b.

PIERI, F. A. et al. Inhibition of *Escherichia coli* from mastitic milk by copaiba oil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. Suppl 1, p. 1929-1934, 2011.

PIERI, F. A. et al. Antimicrobial profile screening of two oils of *Copaifera* genus. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 1, p. 241-244, 2012.

PONTES, A. B. et al. Emulsão dermatológica à base de Copaíba. **Revista Analytica**, v. 07, Out./Nov., 2003.

POLITEO, O. et al. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of twelve spice plants, **Croatica Chemica Acta** v. 79, n.4 p. 545–552, 2006.

POHLMANN, A. R. et al. Spraydried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: Development, stability evaluation and nanostructure models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, p. 305–312, 2012.

PROPHIRO, J. S. et al. Evaluation of time toxicity, residual effect, and growth-inhibiting property of *Carapa guianensis* and *Copaifera* sp. in *Aedes aegypti*. **Parasitology Research**, v. 110, p. 713-719, 2012a.

PROPHIRO, J. S. et al. First report on susceptibility of wild *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) using *Carapa guianensis* (Meliaceae) and *Copaifera* sp. (Leguminosae). **Parasitology Research**, v. 110, p. 699-705, 2012b.

PUISIEUX, F. ; SEILLER, M. *Galênica 5 – les systèmes dispersés : I – Agents de surface et émulsions*. Technique et Documentation, Paris, Lavoisier, 1983.

QUINTANAR-GUERRERO, D. et al. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymeres by a new process based on emulsification-diffusion technique. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 7, p. 1056-1062, 1998.

RAMOS, M. F. S. Desenvolvimento de microcápsulas contendo a fração volátil de copaíba por spray-drying: estudo de estabilidade e avaliação farmacológica. 2006. 132p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêutica de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SACHETTI, C. G. et al. Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 937-941, 2009.

SACHETTI, C. G. et al. Developmental toxicity of copaiba tree (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae) oleoresin in rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 5, p. 1080-1085, 2011.

SANT'ANNA, B. M. P. et al. Characterization of Woody Odorant Contributors in Copaiba Oil (*Copaifera multijuga* Hayne). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 5, p. 984-989, 2007.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S. et al. Coloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 208 (1-2), p. 71-80, 2000.

SANTOS, J. C. O. et al. Thermoanalytical, kinetic and rheological parameters of commercial edible vegetable oils. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 75, p. 419-428, 2004.

SANTOS, A. O. et al. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 204-208, 2008a.

SANTOS, A. O. et al. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 3, p. 277-81, mai., 2008b.

SANTOS, A. O. et al. *Leishmania amazonensis*: Effects of oral treatment with copaiba oil in mice. **Experimental Parasitology**, v. 129, n. 2, p. 145-151, 2011.

SANTOS, R. C. V et al. Antimicrobial activity of Amazonian oils against *Paenibacillus* species. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 109, n. 3, p. 265-268, 2012a.

SANTOS, A. O. et al. Copaiba Oil: An Alternative to Development of New Drugs against Leishmaniasis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-7, jan., 2012b.

SANTOS, A. O. et al. Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 1, p. 59-64, 2013.

SANTOS, S. S. et al. Formulation and *in vitro* evaluation of coconut oil-core cationic nanocapsules intended for vaginal delivery of clotrimazole. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 116, p. 270-276, 2014.

SCHAFFAZICK, S. R et al. Caracterização e Estudo de Estabilidade de Suspensões de Nanocápsulas e de Nanoesferas Poliméricas Contendo Diclofenaco. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 21, n. 2, p. 99-106, 2002.

SCHAFFAZICK, S. R et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SEFIDKON, F. et al. Analysis of the Essential Oil of *Lallemantia peltata* from Iran. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 9, n. 1, p. 42-46, 2006.

SILVA, I. G.; ZANON, V. O. M.; SILVA, H. H. G. Larvicidal Activity of *Copaifera reticulata* Ducke Oil-Resin against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 32, n. 4, p. 729-732, 2003.

SILVA, H. H. G. et al. Larvicidal activity of oil-resin fractions from the Brazilian medicinal plant *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae-Caesalpinioideae) against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 264-267, 2007.

SILVA, J. J. L. et al. Effects of *Copaifera langsdorffii* Desf. on ischemia-reperfusion of randomized skin flaps in rats. **Aesthetic Plastic Surgery**, v. 33, p. 104-109, 2009.

SILVA, E. S. et al. Análise físico-química do óleo-resina e variabilidade genética de copaíba na Floresta Nacional do Tapajós. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 11, p. 1621-1628, 2012_a.

SILVA, A. G. et al. Application of the Essential Oil from Copaiba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) for Acne Vulgaris: a Double-Blind, Placebo Controlled Clinical Trial. **Alternative Medicine Review**, v.17, n. 1, 2012_b.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5ª edição. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis:UFSC, 2004.

SOPPIMATH, K. S. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices, **Journal of Controlled Release**, v. 70. p. 1-20, 2001.

SOUSA, J. P. B. *Copaifera lansdorffii*: estudo fitoquímico, validação de métodos cromatográficos e análise sazonal. 2011a. 179 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

SOUSA, J. P. B. et al. Validation of a gas chromatographic method to quantify sesquiterpenes in copaiba oils. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, p. 653–659, 2011_b.

SOUZA, P. M. S. et al. Desenvolvimento de nanocápsulas de poli ϵ -caprolactona contendo o herbicida atrazina. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 132-137, 2012.

SUNDUFU, A. J. et al. Electrophysiology and Behavioural Feedback of Diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lep., Plutellidae) to Volatiles from a non-Host Plant, *Lantana camara* L. (Verbenaceae var. aculeate). **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 9, n. 1, p. 1-16, 2006.

TAPPIN, M. R. R. et al. Análise química quantitativa para a padronização do óleo de copaíba por Cromatografia em fase gasosa de alta resolução. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 236-240, 2004.

TRINDADE, F. T. T. et al. *Copaifera multijuga* ethanolic extracts, oilresin, and its derivatives display larvicidal activity against *Anopheles darlingi* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 3, p. 464-470, Mai./Jun., 2013.

VASCONCELOS, K. V. F. et al. Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de um cimento odontológico à base de óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18 (Supl.), p. 733-738, Dez., 2008.

VEIGA JUNIOR, V. F. et al. Phytochemical and Antioedematogenic Studies of Commercial Copaiba Oils Available in Brazil. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 476-480, 2001.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O Gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.

VEIGA JUNIOR, V. F. et al. Plantas medicinais: Cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VEIGA JUNIOR, V. F. et al. The inhibition of paw oedema formation caused by the oil of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, p. 1405-1410, 2006.

VEIGA JUNIOR, V. F. et al. Constituintes das sementes de *Copaifera officinalis* L. **Acta Amazônica**, v. 37, n. 1, p. 123-126, 2007a.

VEIGA JUNIOR, V. F. et al. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne - A comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 2, p. 248-254, 2007b.

VIEIRA, R. C. et al. Influência do óleo de *Copaifera langsdorffii* no reparo de ferida cirúrgica em presença de corpo estranho. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 8, p. 358-366, 2008.

VIRIATO, E. P. et al. Study of high dilutions of copaiba oil on inflammatory process. **International Journal of High Dilution Research**, v. 8, n. 26, p. 9-14, 2009.

YOUNG, J. C. et al. Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by oral administration of β -caryophyllene, a sesquiterpene. **Life Science**, v. 80, p. 932-939, 2007.

ZIECH, R. E. et al. Atividade antimicrobiana do oleorresina de *Copaifera reticulata* frente a *Staphylococcus* coagulase positiva isolados de casos de otite em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 7, p. 909-913, 2013.

ZOGHBI, M. G. B et al. Chemical variation in the volatiles of *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae) growing wild in the states of Pará and Amapá, Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 21, n. 6, p. 501-503, 2009.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

- MARTINS, M.; KLUCZKOVSKI, A. M.; SOUZA, T. P.; **PACHECO, C. C.**; SAVI, G. D.; SCUSSEL, V. M. Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* by guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) and jucá (*Libidibia ferrea* Mart) extracts. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, p. 131-137, 2014.
- ALENO, DENISE MORAIS LOPES; CARVALHO, ROSANY PICCOLOTTO; ARAÚJO BOLETI, ANA PAULA; LIMA, ARLEILSON SOUSA; ALMEIDA, PATRICIA DANIELLE OLIVEIRA; **PACHECO, CAROLINA CARVALHO**; SOUZA, TATIANE PEREIRA; LIMA, EMERSON SILVA. Extract from *Eugenia punicifolia* is an Antioxidant and Inhibits Enzymes Related to Metabolic Syndrome. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, p. 1-15, 2013.
- RIBEIRO, P.; LIBORIO, J.; VALENTIM, C.; CASTRO, S. R.; NOBREGA, V.; **PACHECO, C. C.**; SOUZA, R. O. S.; LIMA, E. S.; LIMA, A. A. N. Avaliação físico-química de droga vegetal e estudos de atividade biológica *in vitro* de extratos secos de *Passiflora Nitida* Kunth. In: III Encontro Brasileiro de Inovação Terapêutica, 2013, Recife. Anais III Encontro Brasileiro de Inovação Terapêutica, 2013.
- **PACHECO, C. C.**; MARINHO, J. S.; LUCCA, L. G.; KOESTER, L. S.; VEIGA JUNIOR, V. F.; SOUZA, T. P. Development and characterization of nanocapsules containing *Copaifera reticulata* Ducke oil. In: 9 International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2013, Ribeirão Preto. Anais 9 International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2013.
- RODRIGUES, I. C.; **PACHECO, C. C.**; ARAUJO, R. O. V.; COSTA, P. R. C.; CHAVES, F. C. M.; COSTA, J. V. B.; SOUZA, T. P. Caracterização físico-química das folhas de *Vismia guianensis* (Aubl) Pers. In: XXII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 2012, Bento Gonçalves. XXII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 2012.